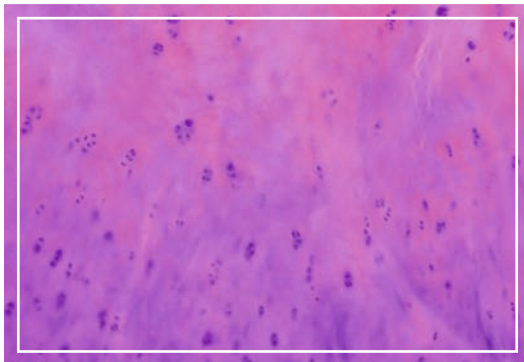


# Matrixassoziierte Chondrozytenimplantation im Vergleich mit dreidimensionalen trägerfreien Knorpeltransplantaten

---

**CHRISTIAN STELZENBACH**



**INAUGURALDISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

# **Matrixassoziierte Chondrozytenimplantation im Vergleich mit dreidimensionalen trägerfreien Knorpeltransplantaten**

## **Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Christian Stelzenbach**

aus Gießen

Gießen 2011

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie  
der Universitätsklinik Giessen und Marburg GmbH, Standort Giessen  
(Direktor: Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. med. Dr. med. vet. Dr. h. c. Reinhard Schnettler)

Gutachter: PD Dr. C. Meyer

Gutachter: Prof. Dr. G. Gruber

Tag der Disputation: 19.03.2013

Meiner Familie

**I. Inhaltsverzeichnis**

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
III.	Abbildungsverzeichnis .....	XI
1	Allgemeine Einführung .....	1
1.1	Knorpelgewebe.....	1
1.1.1	Struktureller Aufbau hyalinen Knorpels .....	1
1.1.2	Bestandteile des hyalinen Knorpels .....	3
1.1.2.1	Chondrozyten .....	3
1.1.2.2	Extrazelluläre Matrix.....	3
1.2	Häufigkeit von Gelenkknorpeldefekten .....	4
1.3	Ursachen für chondrale oder osteochondrale Defekte .....	4
1.4	Osteochondrosis dissecans .....	5
1.5	Klassifikation von Knorpelschäden.....	5
1.6	Diagnostik von Knorpelschäden .....	6
1.7	Spontane Reparaturmechanismen .....	7
1.8	Behandlung des Knorpelschadens.....	7
1.8.1	Konservative Therapie des Knorpelschadens .....	7
1.8.2	Operative Therapie des Knorpelschadens .....	8
1.8.2.1	Lavage .....	8
1.8.2.2	Knorpelglättende Verfahren .....	8
1.8.2.3	Knochenmarkstimulierende Methoden .....	8
1.8.2.4	Transplantationstechniken.....	8
1.8.2.4.1	Periost- und Perichondriumtransplantation .....	9
1.8.2.4.2	Knorpel-Knochen-Transplantation .....	9
1.8.2.4.3	Autologe Chondrozytenimplantation (ACI).....	10
1.9	Indikationsempfehlungen für die biologische Rekonstruktion von Knorpelschäden .	11
2	Ziel der Arbeit .....	12
3	Material und Methoden .....	13
3.1	Liste der verwendeten Materialien .....	13
3.2	Anzeige des Versuchsvorhabens .....	14
3.3	Wahl des Tiermodells (Pferd) zur vergleichenden Untersuchung unterschiedlicher Operationsmaterialien der Chondrozytenimplantation.....	15
3.4	Versuchstiere .....	15

3.5 Gewinnung des Knorpelgewebes .....	16
3.5.1 Operationsvorbereitung .....	16
3.5.2 Knorpelzellentnahme .....	16
3.6 Chondrozytenisolierung .....	17
3.7 Zellkultivierung für die Trägermaterialien.....	18
3.8 Dreidimensionales trägerfreies Knorpeltransplantat (DTK) .....	19
3.9 Trägermaterialien .....	20
3.10 Implantation der Transplantate.....	21
3.11 Klinische Verlaufskontrolle .....	23
3.12 Röntgenkontrolle .....	26
3.13 Ganganalyse .....	26
3.13.1 Sichtbefund.....	26
3.13.2 Computerkinematographie .....	27
3.14 Euthanasie .....	27
3.15 Probenentnahme .....	29
3.16 ICRS-Score.....	30
3.17 Labortechnische Untersuchungen .....	30
3.17.1 Fixierung und Einbettung.....	30
3.17.2 Haematoxylin-Eosin-Färbung .....	31
3.17.3 Alcian-Färbung.....	32
3.17.4 Safranin-O-Färbung .....	32
3.17.5 Toluidin-Färbung .....	33
3.17.6 Immunhistochemie .....	33
3.18 O`Driscoll-Score .....	34
3.19 Graphische Auswertung der Defektfüllungen .....	34
3.20 Statistische Tests .....	35
3.20.1 ANOVA-Test .....	35
3.20.2 Chi-Quadrat-Test ( $X^2$ -Test).....	37
4 Ergebnisse .....	38
4.1 Klinischer Verlauf .....	38
4.2 Ganganalyse .....	38
4.3 Radiologische Befundung .....	39
4.4 Graphische Auswertung der Defektfüllungen .....	41
4.5 Regeneratgewebe.....	42

4.5.1	Dreidimensionales trägerfreies Konstrukt (DTK).....	45
4.5.2	Kollagen I/III-Membran (KI/III).....	49
4.5.3	Hyaluronsäure-Vlies (H) .....	52
4.5.4	Kombination aus Hyaluronsäure-Vlies und Kollagen I/III-Membran (H&KI/III) .....	56
4.5.5	Kollagen I-Gel (KI).....	60
4.6	ICRS-Score.....	63
4.7	O`Driscoll-Score .....	64
5	Diskussion .....	66
5.1	Operative Behandlung des Knorpelschadens .....	66
5.2	Matrixassoziierte Chondrozytenimplantation .....	68
5.3	Eigenschaften von Trägermaterialien.....	70
5.4	Dreidimensionales trägerfreies Konstrukt (DTK).....	71
5.5	Tiermodell .....	71
5.6	Transplantat-Fixierung .....	72
5.7	Klinische Befunde .....	73
5.8	Ganganalyse .....	73
5.9	Regeneratgewebe.....	74
5.10	Schlussfolgerungen .....	77
6	Zusammenfassung .....	78
7	Summary .....	80
8	Literaturverzeichnis.....	81
9	Erklärung .....	91
10	Danksagung .....	92



**II. Abkürzungsverzeichnis****A**

Abb.	Abbildung
Abw.	Abweichung
ACI	Autologe Chondrozytenimplantation
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
ANOVA	Analysis of Variance
Aqua dest.	destilliertes Wasser

**B**

BD	Belastungsdauer
----	-----------------

**C**

°C	Grad Celsius
CKG	Computerkinematographie

**D**

DGOOC	Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie
DGU	Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTK	Dreidimensionales trägerfreies Knorpeltransplantat

**E**

e. V.	eingetragener Verein
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

**F**

Fa.	Firma
FCS	Fetal Calf Serum
FZMB	Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie

**G**

g	Gramm
G	Erdgravitation
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung

**H**

H	Hyaluronsäure-Vlies
H&K	Kombination aus Hyaluronsäure-Vlies und Kollagen I/III-Membran
HE	Hämatoxylin-Eosin
HK	hyaliner Knorpel
HL	hinten links
HR	hinten rechts

**I**

i.v.	intravenös
i.m.	intramuskulär
ICRS	International Cartilage Repair Society
IE	Injektionseinheiten

**K**

kg	Kilogramm
KI	Kollagen I-Gel

KI/III	Kollagen I/III-Membran
KKT	Knorpel-Knochen-Transplantation

**L**

li	links
----	-------

**M**

MACI	Matrixassoziierte autologe Chondrozytenimplantation
MACT	Matrixassoziierte autologe Chondrozytentransplantation
MEA	2-Methoxyethylacetat
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie

**N**

NaCl	Natrium-Chlorid
NSAP	Nichtsteroidale Antiphlogistika
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika

**O**

OATS	Osteochondral Autologous Transfer System
------	--

**P**

PBS	Phosphate Buffered Saline
-----	---------------------------

**R**

re	rechts
REM	Rasterelektronenmikroskopie

**S**

s.u.	siehe unten
SK	subchondraler Knochen
<b>T</b>	
T	Transplantat
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

Nicht in diesem Verzeichnis aufgeführte Abkürzungen werden unter Verwendung der geltenden IUPAC-Nomenklatur oder der allgemein üblichen Bezeichnung benannt bzw. abgekürzt.

### III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau des hyalinen Knorpels .....	2
Abb. 2: Eingravierte Hufe, Pferd Nr. 8 .....	16
Abb. 3: Pferd in Intubationsnarkose .....	17
Abb. 4: Implantation der Transplantate.....	25
Abb. 5: Beugeprobe des linken Kniegelenkes und Videodokumentation des Gangbildes .....	26
Abb. 6: Ausschnitt aus einem Computerkinetogramm von Pferd 17.....	28
Abb. 7: Präparation für die makroskopische Begutachtung.....	29
Abb. 8: Makroskopischer Befund im Längsschnitt.....	29
Abb. 9: Graphische Auswertung der Defektfüllungen.....	35
Abb. 10: Radiologischer Befund am Beispiel des rechten Kniegelenks von Pferd Nr. 18 in 2 Ebenen .....	39
Abb. 11: Makroskopisches Beispielbild nach MACI (Pferd 14 li, Hyaluronsäure-Vlies).....	43
Abb. 12: Histologisches Beispielbild nach MACI (Pferd 17 re, H&KI/III) .....	44
Abb. 13: Immunhistochemisches Beispielbild nach MACI (Pferd 20 re, Kollagen I-Gel) .....	44
Abb. 14: Makroskopischer Befund nach Implantation des DTK (Pferd 6 li) .....	45
Abb. 15: Makroskopischer Befund nach Implantation des DTK (Pferd 10 li) .....	45
Abb. 16: Histologischer Befund nach Implantation des DTK (Pferde 6 li und 8 re).....	46

Abb. 17: Immunhistochemischer Befund nach Implantation des DTK (Pferd 6 li).....	47
Abb. 18: Histologischer Befund nach Implantation des DTK (Pferde 10 li und 6 re).....	48
Abb. 19: Immunhistochemischer Befund nach Implantation des DTK (Pferd 10 li).....	48
Abb. 20: Makroskopischer Befund nach MACI mit Kollagen I/III-Membran (Pferd 11 li)....	49
Abb. 21: Makroskopischer Befund nach MACI mit Kollagen I/III-Membran (Pferd 21 li)....	49
Abb. 22: Histologischer Befund nach MACI mit Kollagen I/III-Membran (Pferd 11 li).....	50
Abb. 23: Histologischer Befund nach MACI mit Kollagen I/III-Membran (Pferd 7 re) .....	51
Abb. 24: Immunhistochemischer Befund nach MACI mit Kollagen I/III-Membran (Pferd 21 li) .....	51
Abb. 25: Makroskopischer Befund nach MACI mit Hyaluronsäure-Vlies (Pferd 14 li) .....	52
Abb. 26: Makroskopischer Befund nach MACI mit Hyaluronsäure-Vlies (Pferd 14 re) .....	52
Abb. 27: Histologischer Befund nach MACI mit Hyaluronsäure-Vlies (Pferd 12 li).....	54
Abb. 28: Histologischer Befund nach MACI mit Hyaluronsäure-Vlies (Pferd 14 li).....	55
Abb. 29: Immunhistochemischer Befund nach MACI mit Hyaluronsäure-Vlies (Pferd 13 re) .....	55
Abb. 30: Makroskopischer Befund nach MACI mit H&KI/III (Pferd 17 re) .....	56
Abb. 31: Makroskopischer Befund nach MACI mit H&KI/III (Pferd 16 li) .....	57
Abb. 32: Histologischer Befund nach MACI mit H&KI/III (Pferde 17 re, 15 re und 15 li). 58	
Abb. 33: Immunhistochemischer Befund nach MACI mit H&KI/III (Pferd 17 re).....	59
Abb. 34: Makroskopischer Befund nach MACI mit Kollagen I-Gel (Pferd 18 li) .....	60
Abb. 35: Makroskopischer Befund nach MACI mit Kollagen I-Gel (Pferd 19 li) .....	60
Abb. 36: Histologischer Befund nach MACI mit Kollagen I-Gel (Pferde 20 re und 19 li).....	61
Abb. 37: Immunhistochemischer Befund nach MACI mit Kollagen I-Gel (Pferd 20 re).....	62



## 1 Allgemeine Einführung

### 1.1 Knorpelgewebe

Bei Knorpelgewebe handelt es sich um eine spezialisierte Form von Bindegewebe, das an vielen Stellen des menschlichen Körpers vorkommt und mechanischen Belastungen standhalten kann, ohne dabei dauerhaft verformt zu werden [144].

Es gibt drei Arten von Knorpel, die sich aufgrund verschiedener funktioneller Anforderungen entwickelt haben und sich in der Zusammensetzung ihrer Matrices unterscheiden. Neben dem hyalinen Knorpel, der vor allem in Gelenken vorkommt, existieren noch elastischer Knorpel und Faserknorpel [83].

Hyaliner Knorpel ermöglicht das reibungslose Artikulieren der Gelenkpartner und kann Belastungskräfte aufnehmen, die bis zum 5-fachen des Körpergewichts ausmachen können. Adulter Knorpel besitzt weder eine Innervation oder Lymphgefäße noch eine Vaskularisation. Die Ernährung erfolgt über die Synovialflüssigkeit und über Gefäße des subchondralen Knochens [29].

#### 1.1.1 Struktureller Aufbau hyalinen Knorpels

Hyaliner Knorpel besitzt einen 4-schichtigen histologischen Aufbau (Abb. 1):

##### *Zone 1: Tangentialzone*

Diese oberflächliche Zone umfasst 10-20 % der Knorpeldicke. Sie fungiert als Gleitschicht. Die Kollagenfasern sind parallel zur Oberfläche angeordnet. Die Chondrozyten weisen eine eher längliche Form auf und sind inaktiv.

##### *Zone 2: Übergangszone*

In der Übergangszone (40-60 % der Knorpeldicke) steigt die Konzentration an Proteoglykanen. Außerdem sind die Kollagenfasern größer als in Zone 1 und die Chondrozyten lassen eine rundlichere Form erkennen.

##### *Zone 3: Radiärzone*

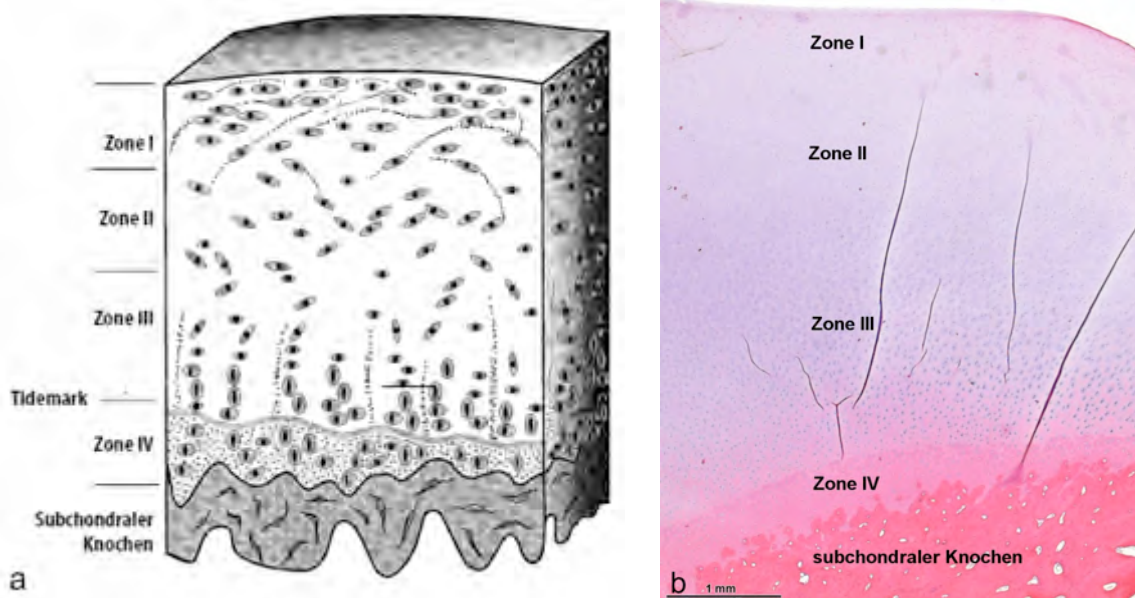
Das Gerüst der tiefen Zone (30-40 % der Knorpeldicke), die auch Radiärzone genannt wird, bilden vertikal zur Oberfläche angeordnete Kollagenfasern. Die Chondrozyten zeigen eine säulenartige Anordnung und sind überwiegend rund.

### Tidemark

Die Grenzlinie zwischen der Radiärzone (Zone 3) und der Zone des mineralisierten Knorpels (Zone 4) bildet die sogenannte „Tidemark“.

### Zone 4: Mineralisierter Knorpel

Die Kalzifizierungszone (mineralisierter Knorpel) stellt die Verbindung zwischen Knorpel und subchondralem Knochen her. Dort inserieren Kollagenfasern in bereits verkalktem Knorpel. Man spricht von einer mechanischen Vernetzung zwischen Knorpel und Knochen [7, 29, 35, 117].



**Abb. 1: Aufbau des hyalinen Knorpels**

a) Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus des hyalinen Knorpels: Zone I: Tangentialzone, Zone II: Übergangszone, Zone III: Radiärzone, Zone IV: kalzifizierte Zone. Die Zonen III und IV sind durch die so genannte „Tidemark“ getrennt (aus Rudert und Wirth 1998).

b) Beispielbild für den histologischen Aufbau von gesundem menschlichem Knorpel, H.E. gefärbt 2,5fach vergrößert (aus dem Labor für Experimentelle Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen).



### 1.1.2 Bestandteile des hyalinen Knorpels

Knorpel besteht aus Zellen (Chondrozyten), die von einer extrazellulären Matrix (ECM) umgeben sind.

#### 1.1.2.1 Chondrozyten

Chondrozyten machen nur einen Anteil von 1-10 % des Knorpelvolumens aus. Sie sind sowohl für die Synthese von Kollagenen und Proteoglykanen als auch für deren Abbau verantwortlich.

Das Aussehen der Zellen kann variieren. So finden sich in oberflächlicheren Bereichen Zellen mit elliptischer Form, wobei die Längsachse parallel zur Knorpeloberfläche verläuft. Im Inneren des Knorpels sind sie rund und liegen nebeneinander in Gruppen. Eine isogene Gruppe geht aus der Teilung einer einzigen Zelle hervor und wird zusammen mit ihrer ECM als Chondron oder Territorium bezeichnet. Die wasserreichen, leicht basophilen Knorpelzellen liegen in glattwandigen Höhlen, die Lakunen genannt werden. *In vivo* füllen die Chondrozyten die Lakunen komplett aus, in mikroskopischen Schnitten liegen sie geschrumpft vor und heben sich gegen die Höhlen ab. Es kommen keine freien Zellen im Knorpel vor.

In gewissen Grenzen haben Chondrozyten die Fähigkeit, ihre Stoffwechsel- und damit die Syntheseleistung den momentanen Belastungsverhältnissen anzupassen [25, 28, 83, 117].

#### 1.1.2.2 Extrazelluläre Matrix

Die ECM bildet 90 % des Knorpelvolumens. 60-80 % davon bestehen aus Wasser, das an Proteoglykane gebunden ist, deren hohe Wasserbindungskapazität für die Druckelastizität des Knorpels sorgt. Das größte und mengenmäßig am stärksten vertretene Proteoglykan mit mehr als 100 Chondroitinsulfat- und Keratansulfatketten wird auch als Aggrekan bezeichnet. Diese Aggrekane können über ein Bindeprotein nicht-kovalent an einen Hyaluronsäurefaden gebunden werden. Die entstehenden Proteoglykanaggregate widerstehen einwirkenden Kompressionen und tragen so zur Stabilität des Knorpels bei.

Neben dem gebundenen Wasser sind die von den Chondrozyten produzierten Kollagene der Hauptbestandteil der ECM. Im menschlichen Knorpel findet man vorrangig Kollagen II, das 80 % des Gesamtkollagens ausmacht und durch einen starken Belastungswiderstand besticht.

In geringeren Mengen finden sich auch andere Kollagentypen, die überwiegend für die Stabilisierung des von ihnen gebildeten Maschenwerks zuständig sind.

Die Kollagenfasern bilden ein Netzwerk und pressen die Proteoglykane zusammen, was eine deutliche Platzersparnis bewirkt [2, 6, 26, 29, 55, 117, 129].

## **1.2 Häufigkeit von Gelenkknorpeldefekten**

Die Inzidenz von Knorpelschäden des Kniegelenks wurde in einer retrospektiven Studie von Curl et al. im Jahre 1997 untersucht. Bei 31.516 Arthroskopien des Knies dokumentierte man 19.827 Läsionen (63 %) [37]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen sowohl Hjelle et al. (2002) in einer 5 Jahre später durchgeführten prospektiven Studie an 1.000 Patienten, bei der in 61 % der arthroskopierten Knie Knorpeldefekte sichtbar waren [65], als auch Aroen et. al in 2004 (Knorpeldefekte bei 66 % von 993 arthroskopisch untersuchten Knien) [5].

## **1.3 Ursachen für chondrale oder osteochondrale Defekte**

Chondralen (auf den Knorpel begrenzten) und osteochondralen (Knorpel und Knochen umfassenden) Defekten können verschiedene Ursachen zu Grunde liegen. Bei jungen Patienten handelt es sich, neben der eher selten vorkommenden Osteochondrosis dissecans (s.u.), meist um akute Traumafolgen, wie z.B. nach Sport- oder Arbeitsunfällen. Neben primären Knorpeldefekten, die ohne Behandlung praktisch nie folgenlos ausheilen, kann es auch zu sekundären Knorpeldefekten nach Läsionen anderer Gelenkpartner, wie z.B. Menisken, Kreuzbänder oder des Knochens kommen [65]. Schäden an Gelenkflächen bei Patienten mittleren bis höheren Lebensalters entstehen oft als Folge eines unbehandelten Unfalls, einer chronischen Überlastung, wie beispielsweise übertrieben monotone Sportarten, Übergewicht, einer Achsfehlstellung oder sind Zeichen altersabhängiger Veränderungen mit einer Verminderung der mechanischen Belastbarkeit. Die Übergänge zwischen physiologischer Alterung, chondraler Schädigung und manifester Arthrose sind fließend [129].

## **1.4 Osteochondrosis dissecans**

Im Gegensatz zu traumatisch bedingten Knorpelschäden steht die Osteochondrosis dissecans, die vor allem im 2. Lebensjahrzehnt auftritt. Ihre Ursache ist bis heute ungeklärt. Als ätiologische Faktoren werden endogene, vaskuläre, mechanische, genetische und bakteriell-infektiöse Ursachen angeführt. Auffallend ist, dass sich Läsionen überwiegend an Stellen mit experimentell nachgewiesenen Druckmaxima und an konvexen Gelenkflächen zeigen. Die Osteochondrosis dissecans zählt zu den aseptischen Knochennekrosen und wird in 4 Stadien eingeteilt: Pathogenetisch zeigt sich anfangs eine durch MRT nachweisbare subchondrale Osteonekrose (Stadium 1), die bei Ausbleiben einer spontanen Regeneration in das Stadium der subchondralen Sklerosierung (Stadium 2) übergeht. Das Stadium 3 ist durch eine Demarkation mit zunehmendem Verlust der Knorpel-Knochen-Integration gekennzeichnet, so dass eine spontane Dislokation möglich ist. Ein freies Dissekat entspricht Stadium 4 [24, 114, 133].

## **1.5 Klassifikation von Knorpelschäden**

Zur Einteilung von Knorpelschäden, die nicht auf dem Boden einer Osteochondrosis dissecans entstanden sind, ist die Klassifikation nach Outerbridge etabliert [109]. Diese wurde vor wenigen Jahren von der International Cartilage Repair Society (ICRS) aufgegriffen und weiter differenziert (Tabelle 1). Zur besseren Vergleichbarkeit wird empfohlen, Gelenkknorpeldefekte einheitlich nach dem ICRS-Score einzuteilen [3].

**Tabelle 1: Knorpelschäden nach dem ICRS-Score [3]**

Grad	Veränderungen am Gelenkknorpel
0	Keine Knorpelschäden erkennbar, glatte, intakte Oberfläche
IA	Annähernd normaler Knorpel: oberflächliche Läsion; Erweichung der Oberfläche
IB	Und/oder oberflächliche Fissuren bzw. Risse
II	Defekte erreichen bis 50 % der gesamten Knorpeldicke
IIIA	Defekte erreichen >50 % der gesamten Knorpeldicke
IIIB	Defekte erreichen die Zonen des mineralisierten Knorpels
IIIC	Defekte erreichen die subchondrale Lamelle
IIID	Blasenbildung periläsional
IVA	Defekte reichen bis kurz unter die subchondrale Lamelle
IVB	Defekte reichen bis tief in den spongiösen Knochen

## 1.6 Diagnostik von Knorpelschäden

Der Gelenkknorpel besitzt keine sensible Innervation. Somit können auch größere Defekte über längere Zeit klinisch asymptomatisch verlaufen. Probleme treten oft erst dann in Erscheinung, wenn sich z.B. ein Dissekat herauslöst und es zu Einklemmungserscheinungen kommt. Da Gelenkknorpel für die klinische Untersuchung nur schwer zugänglich ist und sich Symptome wie Schmerzen, Einschränkung der Beweglichkeit und Erguss als recht unspezifisch erweisen, sind bildgebende Verfahren zur Diagnosefindung unerlässlich. Nativradiologisch lassen sich nur Zeichen fortgeschrittener Stadien eines Knorpeldefekts durch subchondrale Sklerosierung, Gelenkspaltverschmälerung, Exophyten und Geröllzysten erkennen. Moderne Kernspintomographen ermöglichen hingegen sehr detaillierte Aufnahmen des Gelenkknorpels. Bereits in der Frühphase der chondralen Schädigung findet man im Magnetresonanztomographie-Scan (MRT-Scan) fokale Ödeme und Unregelmäßigkeiten der Oberfläche. Tiefer gehende Risse bzw. Fissuren bis auf die subchondrale Platte lassen sich ebenfalls mit Hilfe der MRT darstellen. Die genaueste Methode in der Diagnostik der Knorpelschäden stellt nach wie vor die Arthroskopie dar, bei der man sich durch direkte Betrachtung und/oder palpatorische Untersuchung ein Bild über das Ausmaß der Schädigung macht. Zudem können hierbei erste therapeutische Maßnahmen ergriffen werden [51, 131].

## **1.7 Spontane Reparaturmechanismen**

Aufgrund der limitierten Regenerationsfähigkeit des hyalinen Knorpels besteht eine schlechte Heilungstendenz [44]. Ohne Behandlung setzen spontane Reparaturmechanismen ein, die sich aufgrund der Avaskularität des Knorpels von anderen Geweben unterscheiden. Bei oberflächlichen Verletzungen beobachtet man eine kurzzeitig andauernde Matrixsynthese und erhöhte mitotische Aktivität der angrenzenden Chondrozyten, die als Zellhaufen, sogenannte Cluster, nebeneinander liegen. Aufgrund des dichten Netzes aus Kollagenfasern und Proteoglykanen vermögen die Zellen jedoch nicht, an den Ort der Schädigung zu wandern. Eine Heilung bleibt somit aus, aber auch das Fortschreiten zu einer Arthrose wird nicht begünstigt [27, 29, 56]. Bei der Eröffnung der vaskularisierten subchondralen Zone kommt es zur Zelleinwanderung aus dem Knochen. Die Reparation geht von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen aus. Zunächst entsteht ein hyalinartiger Knorpel, der sich nach 6-12 Monaten in biomechanisch minderwertigen Faserknorpel umwandelt. Eine vollständige Vernetzung der Kollagenfasern des gesunden angrenzenden Knorpels mit den Fasern des neuen Gewebes findet nicht statt [29, 124].

## **1.8 Behandlung des Knorpelschadens**

Zur Behandlung von Knorpelschäden stehen sehr verschiedene und unterschiedlich wirksame Therapieformen zur Verfügung, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

### **1.8.1 Konservative Therapie des Knorpelschadens**

Konservative Maßnahmen beinhalten eine krankengymnastische Übungstherapie, orthopädische Hilfsmittel (z.B. Einlagen) und physikalische Anwendungen. Diese können ergänzt werden durch eine medikamentöse Therapie mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) und die intraartikuläre Injektion von Chondroprotektiva. Es zeigt sich zwar eine vorübergehende klinische Befundverbesserung [119], eine Heilung des geschädigten hyalinen Knorpels wird dadurch jedoch nicht erreicht.

## **1.8.2 Operative Therapie des Knorpelschadens**

### **1.8.2.1 Lavage**

Bei der Gelenkspülung (Lavage) wird das Gelenk im Rahmen einer Arthroskopie mit einer Spülflüssigkeit (z.B. 0,9 %-NaCl-Lösung) von Detritus und Entzündungszellen befreit und somit eine sekundäre Synovialitis behandelt. [78, 79]. In einer prospektiv angelegten Studie von Moseley et al. (2002) zeigte sich jedoch im Vergleich zur Placebogruppe kein Benefit für Patienten, die mit Lavage behandelt wurden [101].

### **1.8.2.2 Knorpelglättende Verfahren**

Zu den knorpelglättenden Verfahren zählen Débridement, Shaving und radiochirurgische Anwendungen. Beim Débridement, das 1941 erstmals als offene Operation beschrieben wurde [91] und heutzutage meist arthroskopisch erfolgt, werden aufgefaserte Knorpelflächen geglättet (Shaving), Meniskusrisse saniert, Osteophyten abgetragen, Teilsynovektomien durchgeführt und das Gelenk von freien und instabilen Gelenkkörpern befreit. Diese Maßnahmen sind begleitend bei jeder Operation am Knorpel sinnvoll. Daneben gibt es radiochirurgische Systeme auf der Grundlage von Hochfrequenzstrom (monopolare und bipolare Technik), die bei Knorpelschäden Grad II-III zum Einsatz kommen [145].

### **1.8.2.3 Knochenmarkstimulierende Methoden**

Bei Knorpeldefekten, die bis auf den subchondralen Knochen reichen, greift man zu knochenmarkstimulierenden Operationsmethoden, welche die subchondrale Bohrung [113], die Abrasionsarthroplastik [81] und die Mikrofrakturierung beinhalten [132]. Ziel dieser Techniken ist es, die Einwanderung pluripotenter Stammzellen aus dem Knochenmark zu erreichen, die sich nach der Bildung eines Fibrinpfropfes im Defekt in Knorpelzellen mit darauf folgender Ausbildung eines fibrokartilaginären Gewebes umwandeln [74, 85, 130].

### **1.8.2.4 Transplantationstechniken**

Neben knorpelglättenden und knochenmarkstimulierenden Verfahren hielten unterschiedliche Transplantationstechniken Einzug in die Therapie von Knorpelschäden.

#### **1.8.2.4.1 Periost- und Perichondriumtransplantation**

Bereits in den 1970er Jahren verpflanzte man vom Rippenknorpel gewonnenes Perichondrium in Knorpeldefekte [127, 136].

Bei dieser Form der Transplantation wird das Periost oder das Perichondrium mit der Kambiumschicht zum Defekt hin auf einem Knorpelschaden befestigt. Die sich in diesen Geweben befindlichen pluripotenten Stammzellen können sich zu aktiven Fibrozyten, die in der Folge Faserknorpel bilden, oder im günstigsten Fall zu synthesesfähigen Chondrozyten umwandeln [128].

#### **1.8.2.4.2 Knorpel-Knochen-Transplantation**

Bei der Knorpel-Knochen-Transplantation (KKT) stehen die Verfahren der autologen KKT und der allogenen KKT zur Verfügung.

Die orthotope autologe KKT wurde erstmals von Wagner 1972 vorgestellt [142] und wird heute in der internationalen Literatur als „Osteochondral Autologous Transfer System (OATS)“ bezeichnet. Bei dieser Technik werden autologe Knorpel-Knochen-Zylinder aus weniger belasteten Arealen des Kniegelenks entnommen und in Knorpeldefekte der Belastungszonen transplantiert. Nicht nur der geschädigte Knorpel, sondern auch der darunter liegende pathologisch veränderte Knochen werden durch einen vitalen Knorpel-Knochen-Zylinder ersetzt [123]. Bei der Wahl des Transplantates ist auf eine vergleichbare Oberflächenkrümmung zu achten, um eine möglichst kongruente Defektdeckung erreichen zu können. Am Kniegelenk eignen sich für die Belastungszonen der Femurkondylen am ehesten Transplantate aus der antero-medialen oder antero-lateralen Trochlea [12, 69]. Bei dem als „Mosaikplastik“ bezeichneten Verfahren der KKT werden mehrere Knorpel-Knochen-Zylinder in einen Defekt eingebracht.

Es wird berichtet, dass die Anwendung des beschriebenen Verfahrens zu einer schnellen und zuverlässigen Einheilung des knöchernen Anteils des transferierten osteochondralen Dübels in den spongiösen Empfänger Knochen führt [92]. Tierexperimentell konnte bei Pressfit-Verankerung der Transplantate sowohl eine hohe Präzision als auch eine frühzeitige stabile Verbindung mit dem spongiösen Knochen nachgewiesen werden [43]. Aufgrund der Entnahmemorbidität und der dadurch begründeten Größenbeschränkung wird eine Indikationsbegrenzung für die Mosaikplastik auf Defekte von maximal 4 cm<sup>2</sup> Ausdehnung empfohlen [61, 69, 123].

Im Gegensatz zur autologen KKT hat die allogene KKT den Vorteil, dass kein weiteres Knorpelgewebe des Empfängers geschädigt wird. Zudem kann eine recht ähnliche Knorpeldicke und Oberflächenkrümmung der Gelenkfläche durch Verwendung eines Implantats aus der korrespondierenden Region des Spenders erreicht werden. Mittel- bis langfristige Verlaufsbeobachtungen sind jedoch in der Regel schlecht, da die Knorpelzellen die Konservierung (tief gefroren oder bestrahlt) offensichtlich nicht in ausreichender Zahl überleben [30, 76]. Czitrom et al. (1990) konnten 6 Jahre nach Implantation nur noch 37 % vitale Zellen nachweisen [38].

#### **1.8.2.4.3 Autologe Chondrozytenimplantation (ACI)**

Ein weiteres Verfahren zur biologischen Rekonstruktion vollschichtiger Knorpelschäden wurde 1994 von Brittberg beschrieben: Die autologe Chondrozytenimplantation (ACI) [21]. Hier wird bei einer ersten Arthroskopie ein 2-4 mm großes Knorpelstück aus einem wenig belasteten Gelenkareal entnommen, aus dem in zertifizierten Laboren autologe Chondrozyten angezüchtet werden. Nach Erreichen einer definierten Zellzahl erfolgt die Herstellung einer Zellsuspension.

Im Rahmen einer Arthrotomie wird der Defekt zunächst sorgfältig präpariert, ohne die subchondrale Platte zu eröffnen [93]. Bei der klassischen Form der ACI wird die Zellsuspension dann unter einen Periostlappen gespritzt, welcher meist der proximalen medialen Tibiafläche entnommen, dem Areal aufgenäht wird und den Knorpeldefekt deckt.

Anstelle eines Periostlappens kann alternativ auch ein Biomaterial verwendet werden. Insbesondere Kollagene zeichnen sich hierbei durch eine gute Biokompatibilität aus [134]. Gomoll et al. (2009) berichten über einen Rückgang der revisionspflichtigen Transplantathypertrophie von 25,7 % auf 5 % bei Verwendung einer Kollagen-Membran anstelle eines Periostlappens [58].

Zur Verbesserung der biologischen Eigenschaften und zur Vereinfachung der operativen Handhabung wurden weitere Veränderungen der klassischen ACI entwickelt [94]. Unter Matrixassoziierter Chondrozytenimplantation (MACI) versteht man eine Modifikation der klassischen ACI, bei der Biomaterialien als Trägersubstanzen (Matrices) verwendet werden. Bereits *in vitro* werden kultivierte Chondrozyten auf die Trägersubstanzen aufgetragen und weiter kultiviert. Anschließend werden diese matrixassozierten autologen Chondrozytenimplantate ohne weitere Abdeckung in den präparierten Knorpeldefekt eingebracht, was den operativen Eingriff wesentlich vereinfacht. Das Heben und das Annähen



eines Periostlappens entfallen. Bei guter Adhärenz des Transplantates ist eine weitere Fixierung häufig nicht notwendig. Bei einigen Techniken wird die Fixierung des Transplantates am subchondralen Knochen und/oder angrenzenden Knorpel mit Fibrinkleber empfohlen. In Ausnahmefällen kann eine Fixierung des Zell-Matrix-Konstruktes durch chirurgische Nähte erforderlich sein [15, 93, 94].

## 1.9 Indikationsempfehlungen für die biologische Rekonstruktion von Knorpelschäden

Die Arbeitsgemeinschaft „Gewebereneration und Gewebeersatz“ der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) und der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC) gab in einer Übersichtsarbeit im Jahre 2004 Behandlungsempfehlungen für die operative Knorpeltherapie. Diese richten sich nach dem Alter der Patienten und der Defektgröße (Tabelle 2) [15].

**Tabelle 2: Indikationsempfehlungen für die biologische Rekonstruktion von Knorpelschäden nach Behrens et al. (2004) [15]. (+++ sehr empfehlenswert, + empfehlenswert, - nicht empfohlen).**

	Tissue Response (Mikrofrakturierung)	Knorpel-Knochen- Transplantation	Autologe Chondrozyten- implantation (ACI)
Kinder und Jugendliche	+++	+	-
Defekte bis 2cm <sup>2</sup>	+++	+	-
Defekte zwischen 2-4cm <sup>2</sup>	+	+++	+
Defekte größer 3-4cm <sup>2</sup>	-	+	+++

## 2 Ziel der Arbeit

Die Behandlung von Gelenkknorpelschäden stellt ein häufiges Problem in der Unfallchirurgie und Orthopädie dar.

Dies liegt im Wesentlichen darin begründet, dass bis heute keine Therapie bekannt ist, mit Hilfe derer eine „Restitutio ad integrum“ erreicht werden kann.

Das Tissue Engineering von Knorpelzellen liefert Konstrukte für Knorpelersatzgewebe, die traumatisch oder degenerativ veränderten Knorpel in seiner ursprünglichen Funktion wieder herstellen sollen. Solche dreidimensionalen Konstrukte existieren bereits auf der Grundlage unterschiedlicher biologischer oder synthetischer Materialien.

Ziel der hier vorgestellten experimentellen Studie war, anhand eines Großtiermodells Knorpelregenerate zu vergleichen, die nach Implantation von Chondrozyten auf unterschiedliche Trägermaterialien bzw. eines dreidimensionalen trägerfreien Knorpeltransplantates entstehen.

Hierzu wurden Pferden entweder ein Kollagen I-Gel, eine Kollagen I/III-Membran, ein Hyaluronsäure-Vlies und die Kombination aus letzteren beiden oder ein dreidimensionales trägerfreies Konstrukt (DTK), bestehend aus druckkultivierten Knorpelzellen, implantiert.

Folgende Fragen sollten dabei geklärt werden:

- Gibt es Unterschiede in Bezug auf das intraoperative Handling, insbesondere die Fixation der Implantate?
- Zeigen sich postoperativ klinische oder radiologische Befunde, die in Zusammenhang mit der Wahl des Verfahrens gebracht werden können?
- Gibt es im weiteren Verlauf nach Implantation Auffälligkeiten in Bezug auf das Gangbild der Tiere?
- Welche Unterschiede ergibt die makroskopische Begutachtung nach 18 Monaten? Lassen sich gleiche Füllungszustände der Defekte beobachten?
- Zeigen sich Unterschiede bei den histologischen Untersuchungen bezüglich der Zellmorphologie, der Orientierung der Zellen und der extrazellulären Matrix mit ihren hyalin-spezifischen Markern wie Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen nach 18 Monaten?
- Lassen sich 1<sup>1/2</sup> Jahre nach Implantation Abweichungen in der Immunhistochemie erkennen? In welchen Regeneraten kommt es zum Nachweis von Kollagen II?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Liste der verwendeten Materialien

##### Geräte

Digitalkamera	Canon IXUS 50
Kulturflaschen T25 cm <sup>2</sup> x 75 cm <sup>2</sup>	Fa. Sarstedt, Nürnberg
Mikroskop Axioskop2 plus	Fa. Zeiss, Jena
Mikroskop Axioplan 2	Fa. Zeiss, Jena
Narkosegerät Sulla 808V	Fa. Dräger, Lübeck
Rotationsmikrotom RM2155	Fa. Leica Instruments, Nussloch

##### Verbrauchsmaterialien/Reagenzien

Aceton	Fa. Merck, Hohenbrunn
Alcianblau	Fa. Division Chroma, Münster
Alkohol	Fa. Stockmeier Chemie, Dillenburg
Antikörper gegen Kollagen I	Fa. Biomex, Heidelberg
Antikörper gegen Kollagen II	Fa. Calbiochem, San Diego, Canada, USA
Aqua dest.	Fa. Braun, Melsungen
Chromogen Nova Red <sup>®</sup>	Fa. Vector, Burlingame, Canada, USA
Depex <sup>®</sup>	Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg
DMEM <sup>®</sup>	Biochrom AG, Berlin
Dreidimensionales trägerfreies Konstrukt	FZMB GmbH, Bad Langensalza, Abteilung Tissue Engineering
Eisen(III)chlorid	Fa. Merck, Darmstadt
Eosin G	Fa. Merck, Darmstadt
Essigsäure 1 %	Fa. Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fa. Merck, Darmstadt
Fibrinkleber Beriplast P <sup>®</sup>	Fa. Aventis Behring, Frankfurt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fa. Merck, Hohenbrunn
Ham's F 12 <sup>®</sup>	Fa. Biochrom AG, Berlin
Hämalaunlösung	Fa. Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Fa. Merck, Darmstadt
Hyaluronidase	GIBCO, Deutschland
Hyaluronsäure-Vlies (Hyalograft C <sup>®</sup> )	Fa. Fidia Advanced Biopolymers Srl, Abano

	Terme, Italien
Kochsalz-Chlorid 25 %	Fa. Baxter, Unterschleißheim
Kollagen I-Gel (CaReS <sup>®</sup> )	Fa. Arthrokinetics, Esslingen
Kollagen I/III-Membran (Chondro-Gide <sup>®</sup> )	Fa. Geistlich, Baden-Baden
Lichtgrün 0,1 % Certistain <sup>®</sup>	Fa. Merck, Darmstadt
Methylmetacrylat (MEA)	Fa. Merck, Suchardt OHG, Hohenbrunn
Paraffin	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA) 4 %	Fa. Merck, Darmstadt
Perjodsäure 1 %	Fa. Merck, Darmstadt
Phosphate Buffered Saline	Sigma, Taufkirchen
Safranin-O 0,1 %	Safran du Gatinais, Chromagesellschaft Köngen/N
Schiffs Reagenz	Fa. Merck, Darmstadt
Streptavidin-Biotin-Komplex	Fa. Dako, Hamburg
Technovit 7200	Fa. Kulzer, Wertheim/Ts.
Technovit 9100neu <sup>®</sup>	Fa. Heraeus Kulzer, Wertheim
Toluidinblau	Fa. Merck, Darmstadt
Tris Buffered Saline	Fa. Merck, Darmstadt
TritonX 100 0,025 %	Fa. Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Fa. Biochrom, Berlin
Xylol	Fa. Merck, Darmstadt

### 3.2 Anzeige des Versuchsvorhabens

Die Tierversuche waren am 08.10.2004 gemäß §8a Absatz 1 und 2 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 17. Februar 1993, BGBI I, 254 vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz Abteilung 2, Dezernat 22, Weimarplatz 4, 99423 Weimar (jetzt: Tennstedter Straße 8/9, 99947 Bad Langensalza) genehmigt worden (Nr.: 14-04/04). Sie wurden entsprechend den Empfehlungen der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e.V. durchgeführt.

Die Untersuchung wurde finanziell von der Fraunhofer Services GmbH, Berlin unter dem Titel: „Verfahren zur Therapie cartilaginärer Schäden“ (Fördernummer 1090/03, Bewilligungsdatum 15.07.2003) gefördert.

### **3.3 Wahl des Tiermodells (Pferd) zur vergleichenden Untersuchung unterschiedlicher Operationsmaterialien der Chondrozytenimplantation**

In diesem Tierversuch ging es darum, den Unterschied zwischen mit autologen Chondrozyten benetzten Trägermaterialien und einem dreidimensionalem trägerfreien Knorpeltransplantat zu zeigen.

Bei der Suche nach einem geeigneten Großtiermodell, das im Kniegelenk einen dem Menschen vergleichbaren Knorpel besitzt, entschied man sich für das Kniegelenk des Pferdes, da es eine ähnliche Gelenkmorphologie, Biomechanik, Gelenkgröße und Gelenkknorpeldicke sowie ein ähnliches Verhalten der Chondrozyten in Zellkultur aufweist. Des Weiteren ähneln sich auch die gelenkpathologischen Veränderungen von Mensch und Pferd [9, 48-50, 88, 138].

### **3.4 Versuchstiere**

Die Versuchstiere entstammten dem Haflingerzuchtgestüt Meura, Thüringen. Für den Versuch wurden 16 Pferde eingesetzt. Der Kauf erfolgte nach ausgiebiger veterinärmedizinischer Untersuchung, inklusive Röntgen. Im Schnitt wogen die Haflinger 439 kg (400-474 kg) und hatten ein durchschnittliches Alter von 84,7 (23-171) Monaten.

Die Pferde wurden zunächst in den Stallungen des Forschungszentrums für Medizintechnik und Biotechnologie GmbH (FZMB), Bad Langensalza (Leiter der Pferdeklinik: Herr Dr. vet. med. Dirk Barnewitz; Geranienweg 7, 99947 Bad Langensalza) untergebracht. Die Transport GmbH Wiegleben-Aschara stellte in der Folge Weiden und Futterflächen zur Verfügung. Als Nahrung erhielten die Haflinger Wasser, Heu, Stroh und Gras ad libitum. In den ersten 4 Wochen postoperativ fand täglich eine tierärztliche Visite statt, anschließend wöchentlich.

Die Identifikation der Tiere erfolgte durch Nummern, die jeweils in die Hufe eingraviert wurden (siehe Abb. 2).



**Abb. 2: Eingravierte Hufe, Pferd Nr. 8**

### **3.5 Gewinnung des Knorpelgewebes**

#### **3.5.1 Operationsvorbereitung**

Präoperativ wurden die Pferde einer allgemeinen veterinärmedizinischen Untersuchung, einschließlich der Bestimmung von Laborwerten, unterzogen. Die Tiere erhielten eine Nahrungskarenz von 12 Stunden.

#### **3.5.2 Knorpelzellentnahme**

Die Knorpelgewinnung erfolgte im Großtier-OP-Trakt der Tierklinik für Groß- und Kleintiere des FZMB in Bad Langensalza.

Zur Knorpelzüchtung wurden Knorpelzellen aus dem linken Sprunggelenk der Pferde verwendet, um potentielle postoperative Komplikationen am Kniegelenk vor der späteren Implantation der Transplantate zu vermeiden. Die Entnahme erfolgte arthroskopisch bei einer Lagerung der Pferde in Rückenlage. Als Zugang für die Intubationsnarkose der Pferde diente die Vena jugularis.

Zur Sedation wurde das Sedativum Sedivet® mit dem Wirkstoff Romofidinhydrochlorid verabreicht. Anschließend erhielten die Pferde eine gewichtsabhängige Dosis Ketamin 10 % und Diazepam i.v. zur Narkoseeinleitung sowie Phenylbutazon zur Analgesie. Nach der Intubation wurde die Anästhesie durch Isofluran mit dem Narkosegerät Sulla 808V (Fa.

Dräger) aufrechterhalten (Abb. 3). Intraoperativ wurde die Sauerstoffsättigung mit Hilfe eines Pulsoxymeters an der Zunge der Pferde kontrolliert.

Die Tiere erhielten als antibiotische Prophylaxe perioperativ Penstrep<sup>®</sup> (Procain-Benzylpenicillin, 10000 IE/kg i.m.) und Finadyne<sup>®</sup> (Flunixin Megumin, 1,1 mg/kg i.v.) für 3 Tage.

Nach der Hautinzision und der sterilen Abdeckung des OP-Gebietes erfolgte das Auffüllen des Sprunggelenks über eine Kanüle mit Ringerlösung. Durch eine antero-mediale Stichinzision wurde das Arthroskop eingeführt. Nach gründlicher Inspektion des Gelenks mit Ausschluss jeglicher intraartikulärer Pathologie wurden jeweils 3 etwa reiskorngroße Knorpelstücke mit einem Ferris-Smith-Rongeur am lateralen Rollhügel entnommen. Nach dem Wundverschluss erfolgte die Anlage eines Betaisodona-Salben-Verbandes und das Verlegen der Pferde mit Hilfe eines Krans in den gepolsterten Aufwachbereich.



**Abb. 3: Pferd in Intubationsnarkose**

### **3.6 Chondrozytenisolierung**

Nach der Knorpelzellentnahme wurden die Biopsate unter Sterilbedingungen in 1mm x 1mm kleine Stücke zerschnitten. Anschließend erfolgte die enzymatische Anverdauung bis zur Entstehung einer homogenen Zellsuspension. Als Verdauungslösung wurde das Nährmedium Ham's F12 (10 ml/g Knorpel) verwendet und mit 10 % Fetal Calf Serum (FCS), Kollagenase (232 U/ml), Hyaluronidase (490 U/ml), Natrium-Penicillin 100.000 U/l und Streptomycin 100 mg/l supplimentiert. Die vollständige Auflösung der Zellsuspension dauerte bei 37° C im Brutschrank zwischen 16 und 24 Stunden. Danach konnte diese abzentrifugiert und mit

Phosphate buffered saline (PBS) ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen werden. Nach erneuter Zentrifugation und Waschung mit PBS folgten die Zellzahlbestimmung sowie die Vitalitätsbestimmung in der Neubauer-Zählkammer mittels Trypanblau-Färbung. Das Aussäen der isolierten Knorpelzellen erfolgte in Kulturflaschen Tx25  $\text{cm}^2$  oder Tx75  $\text{cm}^2$  mit einer Zelldichte von 5000/ $\text{cm}^2$ .

### 3.7 Zellkultivierung für die Trägermaterialien

Die Chondrozyten wurden gemäß eines international anerkannten Protokolls zur Zellzüchtung kultiviert [96]. Die isolierten Knorpelzellen wurden in Kulturflaschen ausgesät und bei einer  $\text{CO}_2$ -Konzentration von 5 %, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % und einer Temperatur von 37° C im Brutschrank kultiviert. Als Adhäsionsmedium verwendete man eine 1:1-Mischung Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), das ein glucosehaltiges Medium zur Kultivierung von Zellen mit hohem Energiebedarf ist und Ham's F 12, welchem folgende Supplemente zugesetzt wurden: 10 % autologes Serum, Ascorbinsäure 50 mg/l,  $\alpha$ -Ketoglutarat 30 mg/l, Natrium-Penicillin 100.000 U/l und Streptomycin 100 mg/l. Das Medium wurde im Verlauf alle drei Tage ausgewechselt.

Nach Konfluenz der Zellen wurde der Monolayer mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und subkultiviert. Die Zellkultivierung verlief problemlos und es zeigten sich hohe Vitalitätsgrade (>92 %) ohne Kontaminationsfälle (Tabelle 3). Alle Monolayer-Kulturen wurden mit autologen Seren kultiviert. Die empfohlene Zellkonzentration von  $10^6$  Zellen/ $\text{cm}^2$  [18, 82, 94] für die Beimpfung der Träger wurde bei allen Proben bereits nach der ersten Kultivierung erreicht. Alle Zellen wurden in Monolayer-Kulturen bis zum Zeitpunkt der Beimpfung der Träger gehalten. Die Anzüchtung der Zellen für die Pferde 6-17 und 21 erfolgte in der Abteilung Tissue Engineering des Forschungszentrums für Medizintechnik und Biotechnologie GmbH in Bad Langensalza, Deutschland. Die Zellen der Pferde 18-20 wurden im Labor der Firma Athrokinetics, Esslingen, Deutschland ebenfalls nach den vorgenannten Kriterien angezüchtet.

Die geringfügig niedrigere Zellvitalität der Zellen für die Kollagen I-Gruppe lässt sich durch die verlängerte Transportzeit in das Zelllabor der Firma Athrokinetics, Esslingen, Deutschland erklären. Die Verarbeitung aller Knorpelbiopsate verlief problemlos.



### 3.8 Dreidimensionales trägerfreies Knorpeltransplantat (DTK)

Während der Kultivierung für die Herstellung der dreidimensionalen trägerfreien Knorpeltransplantate (DTK) zeigte sich ein geringeres Zellwachstum gegenüber den Zellkulturen für die Trägermaterialien. Dies wird durch die Verwendung einer anderen Charge der Kultivierungsflaschen begründet. Zum Erreichen der nötigen Zellkonzentration waren daher weitere Passagen notwendig.

Anstatt der geplanten zwei 2,0 cm x 1,0 cm großen DTK pro Pferd wurden zwei kleinere DTK der Größe 1,3 cm x 1,0 cm und ein DTK der Größe 1,8 cm x 1,0 cm hergestellt. Somit unterscheiden sich die im Versuch verwendeten DTK bezüglich der Kultivierungsdauer (3 bzw. 5 Wochen) und der Größe.

Bis zum Erreichen einer vollständigen Konfluenz verlief die Zellkultivierung für das DTK analog der Zellkultivierung für die Chondrozyten, die auf die Trägermaterialien aufgebracht wurden.

Nach dem Erreichen der Konfluenz reiften die Monolayerkulturen der DTK noch fünf weitere Tage. Am 6. Tag erfolgte die Entfernung des Mediums und der Monolayer wurde mit 2x10 ml steriler PBS-Lösung (pH 7,4) ohne  $\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{Mg}^{2+}$ -Supplementierung gespült, bevor er vom Kulturgefäßboden abgelöst wurde. Nach vollständiger Lösung wurde das sich in der Suspension befindliche Monolayer-Zell-Vlies unter Zuhilfenahme einer 10 ml-Pipette abgesaugt und in sterile 50 ml-Röhrchen übertragen.

Unter Zugabe von 10 ml Kultivierungs-Medium wurde die Lösung bei 100 G bis 1000 G für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und 5 ml frisches Kulturmedium auf das Pellet gegeben. Das Röhrchen wurde nicht vollständig verschlossen und in den Brutschrank gestellt.

Nach 24-48 Stunden bildete sich aus dem Pellet ein kugelförmiger Zellcluster. Die Reifung des Clusters erfolgte für sieben Tage unter täglichem Wechsel des Kultivierungsmediums. Danach übertrug man diesen mit einem sterilen Löffel in eine Vertiefung einer Multiwell-Platte.

Nach der Übertragung des Zellclusters erfolgte die erste Druckbelastung. Sie wurde mit einem Glaspistill mit glatter, scheibenförmiger Oberfläche durchgeführt. Unter erster Druckbelastung wird die Komprimierung des Clusters bis auf 50 % seiner Anfangsgröße verstanden. Die Druckfrequenz lag bei 0,5 Hz bis 2 Hz, die Belastungszeit zwischen 15 und 25 Sekunden. Das Cluster nahm hierunter eine scheibenförmige Gestalt an. Danach wurde das Medium entfernt, das Cluster gefaltet und umgedreht. Anschließend erfolgte die Weiterkultivierung im Brutschrank mit täglichem Wechsel des Kultivierungsmediums.

Am 2. Tag wurde eine zweimalige Druckbelastung in gleicher Weise durchgeführt, am 3. Tag eine dreimalige. Dieses Verfahren wurde bis zum 5. Kultivierungstag wiederholt. Es entstand eine dreidimensionale, zunehmend stabile Zellstruktur.

Nach Erreichen einer stabilen gelartigen Zellcluster-Form wurde die Druckbelastung auf bis zu 10 Belastungszyklen pro Tag (0,5 Hz – 2 Hz, 15-25 Sekunden) schrittweise erhöht. Nach 12 bis 20 Belastungstagen erreichte das Cluster eine genügende Festigkeit, um für autologe Transplantationen verwendet werden zu können [112, 146].

### 3.9 Trägermaterialien

In der hier vorgestellten Studie kamen folgende Trägermaterialien für die matrixassoziierte autologe Chondrozytenimplantation zum Einsatz:

- *Kollagen I/III-Membran* (KI/III)
- *Hyaluronsäure-Vlies* (H)
- Kombination aus *Hyaluronsäure-Vlies* (basal) und *Kollagen I/III-Membran* (superfizial) (H&K) als zweischichtiges Implantat
- *Kollagen I-Gel* (KI).

Marlovits et al. beschrieben 2004 für die in dieser Studie eingesetzten Trägermaterialien folgende Eigenschaften [94]:

#### Kollagen I/III-Membran

Im histologischen Schnitt stellt sich die Kollagen I/III-Membran als eine Membran aus lockeren Fasern mit großem Durchmesser und kompakten Fasern mit kleinerem Durchmesser dar. Die morphologisch variablen Chondrozyten finden sich nach der Kultivierung besonders als mehrlagige Schicht an der Oberfläche sowie vorwiegend im oberen Drittel der Membran. In der Rasterelektronenmikroskopie (REM) erkennt man ein dreidimensionales Netzwerk aus Kollagenfibrillen unterschiedlicher Stärke. Sie bilden Hohlräume unterschiedlicher Größe. Die kultivierten Zellen stellen sich rundlich, polyklonal bis fibrozytär dar. In der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zeigt sich eine gute Adhärenz der Zellen mit den Trägerfasern. Im Interzellularraum finden sich in unmittelbarer Umgebung der Chondrozyten gebänderte Kollagenfibrillen, die von flockigen Substanzen begleitet werden, welche sich eindeutig vom Trägermaterial unterscheiden.

### Hyaluronsäure-Vlies

Die Fasern des Hyaluronsäure-Vlieses sind in ihrer Stärke einheitlich und stellen sich sehr kompakt im histologischen Schnitt dar. Nach der Infiltration mit den Chondrozyten finden sich Knorpelzellen über das gesamte Trägermaterial verteilt, wobei sich einzelne Zellnester ausbilden. Morphologisch zeigen sich heterogene Zellen. Die von ihnen synthetisierte Matrix ist lokal in größeren Mengen vorhanden und gut gegen das Trägermaterial abgrenzbar. In der REM erkennt man ein dreidimensionales Netzwerk aus gleichartigen Fasern. Die von ihnen gebildeten Hohlräume sind irregulär und wesentlich größer als beim Kollagen-Vlies. In der TEM ist eine gute Adhärenz der Zellen an das Trägermaterial über die synthetisierte extrazelluläre Matrix erkennbar. Die hohe Syntheseaktivität der Zellen zeigt sich in flockigen, filamentösen und gebänderten Matrixbestandteilen, die sich in ihrer nahen Umgebung befinden.

### Kollagen I-Gel

Das Kollagen I-Gel setzt sich aus grobfaserigen Kollagenfibrillen und feinfibrillärem Material zusammen, welches die Zwischenräume der Kollagenfaserbündel auffüllt. Es findet sich eine vollständige, jedoch unregelmäßige Durchsetzung des Trägermaterials mit Zellen, die eine vorwiegend runde bis polygonale Morphologie aufweisen. Durch die verfahrensbedingt kürzere Kultivierungszeit (2 Wochen) ist die Anzahl der nachweisbaren Zellen pro Fläche im Vergleich zu den beiden anderen Matrices deutlich geringer. Die Oberfläche des Kollagen I-Gels imponiert in der REM durch eine fibrilläre Struktur. Die vorhandenen Fasern bilden ein Netzwerk, das dichter ist als bei den beiden anderen Trägermaterialien. Die rundlichen Zellen weisen eine gute Adhärenz zum Trägermaterial auf. In der TEM sind Kollagenfibrillen in der ECM erkennbar, wobei aber eine Unterscheidung zwischen den Trägerfasern und dem von den Zellen produzierten Kollagen nicht möglich ist.

## **3.10 Implantation der Transplantate**

Die Implantation der Transplantate erfolgte entsprechend dem individuellen Zellwachstum bis zum Erreichen der erforderlichen Zellkonzentration von  $10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> am 47. bis 62. Tag (Ø 54,6 Tage) nach der Knorpelzellentnahme. Die matrixassoziierten Chondrozytenimplantate der Kollagen I-Gruppe wurden verfahrensbedingt 14 Tage nach arthroskopischer Entnahme implantiert. Aufgrund des verzögerten Zellwachstums erfolgte die Implantation der trägerfreien Konstrukte am 98. bzw. 100. Tag (Tabelle 3).

Die prä- und perioperativen Maßnahmen waren analog denen der Knorpelzellentnahme. Alle Versuchstiere zeigten sich uneingeschränkt operationsfähig.

Nach erfolgreicher Intubation und Lagerung in Rückenlage wurde das OP-Gebiet gründlich rasiert und nach chirurgischer Hautdesinfektion steril abgedeckt (Abb. 4a). Dem folgte die Arthrotomie durch eine etwa 10 cm lange Hautinzision antero-lateral zwischen dem Ligamentum patellae intermedium und dem Ligamentum patellae laterale. An zwei Kniegelenken musste aufgrund einer vorbestehenden Hautläsion die Arthrotomie antero-medial und die Defektanlage im medialen Patellagleitlager vorgenommen werden (Pferde Nr. 15 links und 16 links). Nach der Gelenkeröffnung wurde mit Hilfe einer Schablone die exakte Größe von 1,5 cm x 2,0 cm des geplanten chondralen Defekts im Bereich des lateralen Patellagleitlagers bestimmt und die vollständige Entfernung des Knorpels ohne Eröffnung der subchondralen Platte mit Skalpell und Kürette durchgeführt (Abb. 4b).

Der Defekt der DTK wurde der jeweiligen Größe des Implantates angepasst. Drei Kniegelenke (Pferd Nr. 6 links, Pferd Nr. 8 rechts, Pferd Nr. 10 rechts) wurden mit der Implantatgröße von 1,0 cm x 1,5 cm versorgt. Die anderen Kniegelenke (Pferd Nr. 6 rechts, Pferd Nr. 8 links, Pferd Nr. 10 links) erhielten jeweils ein Implantat mit einem Durchmesser von 1,0 cm.

Nach dem Zuschneiden der Transplantate mit Hilfe einer Schablone wurden diese in den Defekt eingebracht und mit Fibrinkleber (Berioplast P<sup>®</sup>, Combi-Set 3 ml, Fa. Aventis Behring) fixiert (Abb. 4c-d).

Zur Kontrolle der Fixation des Transplantats wurde das Knie unter Zuhilfenahme des Lagerungskrans passiv durchbewegt. Außer in 2 Kniegelenken (Pferde 7 links (KI/III) und 16 rechts (H&K)) zeigte sich eine sichere Fixierung der Transplantate. Daher wurde beschlossen, das Transplantat in diesen beiden Gelenken zu entfernen und die Tiere als Kontrollgruppe mit Leerdefekt zu verwenden. Anschließend wurde die Wunde durch Kapsel-, Subcutan- und Hautnaht sorgfältig mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl<sup>®</sup> der Stärke 1-0, Fa. Ethicon, Norderstedt) verschlossen (Abb. 4e).

Da ein Tier aus der KI/III-Gruppe postoperativ einen intraartikulären Infekt (Pferd Nr. 9 links) entwickelte und somit für die Auswertung ausfiel, wurde diese Gruppe um ein Pferd (Nr. 21) ergänzt.

### 3.11 Klinische Verlaufskontrolle

Zunächst wurden die Pferde postoperativ für 4 Stunden in einer Einzelbox überwacht. Anschließend wurden sie zur weiteren engmaschigen Kontrolle in einer Gemeinschaftsstallung untergebracht.

Die Pferde unterlagen einer zweiwöchigen Boxenruhe und bekamen gewichtsadaptiert nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) über mindestens 4 Tage zur Schmerzstillung. Dazu erhielten sie über 5 Tage ein Langzeitpenicillin (Penstrep<sup>®</sup>) zur Infektionsprophylaxe. Der Verband wurde unter tierärztlicher Kontrolle bis zum Abschluss der Wundheilung alle 2 Tage gewechselt.

Nach zwei Wochen erfolgte schrittweise die kontrollierte Mobilisierung über einen Zeitraum von 30 Tagen, zuerst auf dem Hof, dann auf einem 6 m x 6 m großen Paddock. Anschließend wurden die Haflinger bis zum Zeitpunkt der Euthanasie auf einer Weide gehalten.

Das Gangbild wurde währenddessen von einem Tierarzt in regelmäßigen Abständen im Hinblick auf Lahmen oder sonstige Auffälligkeiten beobachtet und dokumentiert.

Tabelle 3: Übersicht der Zellkultivierungsdaten

Pferd Nr.	Trägermaterial	Datum ASK	Zellzahl	Vitalität der Zellen	Gewicht des Biopsates (mg)	Datum P0	Datum P1	Datum P2	Datum P3	Datum Aufbringung auf Träger	Datum OP
6	DTK	18.01.05	7,61x10 <sup>5</sup>	> 95 %	146,4	19.01.05	31.01.05	07.02.05	14.03.05	---	28.04.05
8	DTK	18.01.05	3,00x10 <sup>5</sup>	> 95 %	81,5	19.01.05	01.02.05	11.02.05	11.03.05	---	28.04.05
10	DTK	20.01.05	9,08x10 <sup>5</sup>	> 95 %	150,9	21.01.05	01.02.05	07.02.05	10.03.05	---	28.04.05
7	KI/III	18.01.05	5,14x10 <sup>5</sup>	> 95 %	83,2	19.01.05	02.02.05	---	---	17.02.05	08.03.05
9	KI/III	20.01.05	3,74x10 <sup>5</sup>	> 95 %	145,7	21.01.05	02.02.05	---	---	15.02.05	08.03.05
11	KI/III	20.01.05	3,83x10 <sup>5</sup>	> 95 %	111,5	21.01.05	02.02.05	---	---	15.02.05	08.03.05
21	KI/III	03.05.05	6,94x10 <sup>5</sup>	> 95 %	101,5	04.05.05	17.05.05	---	---	29.05.05	21.04.05
12	H	15.02.05	5,10x10 <sup>5</sup>	> 95 %	81,6	16.02.05	28.02.05	---	---	23.03.05	12.04.05
13	H	15.02.05	3,15x10 <sup>5</sup>	> 95 %	72,3	16.02.05	28.02.05	---	---	23.03.05	12.04.05
14	H	15.02.05	3,45x10 <sup>5</sup>	> 95 %	57,0	16.02.05	28.02.05	---	---	23.03.05	12.04.05
15	H&K	16.02.05	3,30x10 <sup>5</sup>	> 95 %	41,1	17.02.05	01.03.05	---	---	29.03.05	19.04.05
16	H&K	16.02.05	3,23x10 <sup>5</sup>	> 95 %	30,0	17.02.05	01.03.05	---	---	29.03.05	19.04.05
17	H&K	16.02.05	5,78x10 <sup>5</sup>	> 95 %	133,1	17.02.05	01.03.05	---	---	29.03.05	19.04.05

Pferd Nr.	Trägermaterial	Datum ASK	Isolierte Gesamtzellzahl	Vitalität	Gewicht des Biopsates (mg)	Datum P0 Aufbringung auf Träger	Datum P1	Datum P2	Datum P3	Datum Kultivierungs- ende	Datum OP
18	KI	01.03.05	7,56x10 <sup>5</sup>	> 92 %	x	03.03.05	---	---	---	14.03.05	15.03.05
19	KI	01.03.05	21,1x10 <sup>5</sup>	> 93 %	x	03.03.05	---	---	---	14.03.05	15.03.05
20	KI	01.03.05	16,8x10 <sup>5</sup>	> 93 %	x	03.03.05	---	---	---	14.03.05	15.03.05

ASK: - Arthroskopie

x: - Biopsatgewicht wurde nicht bestimmt

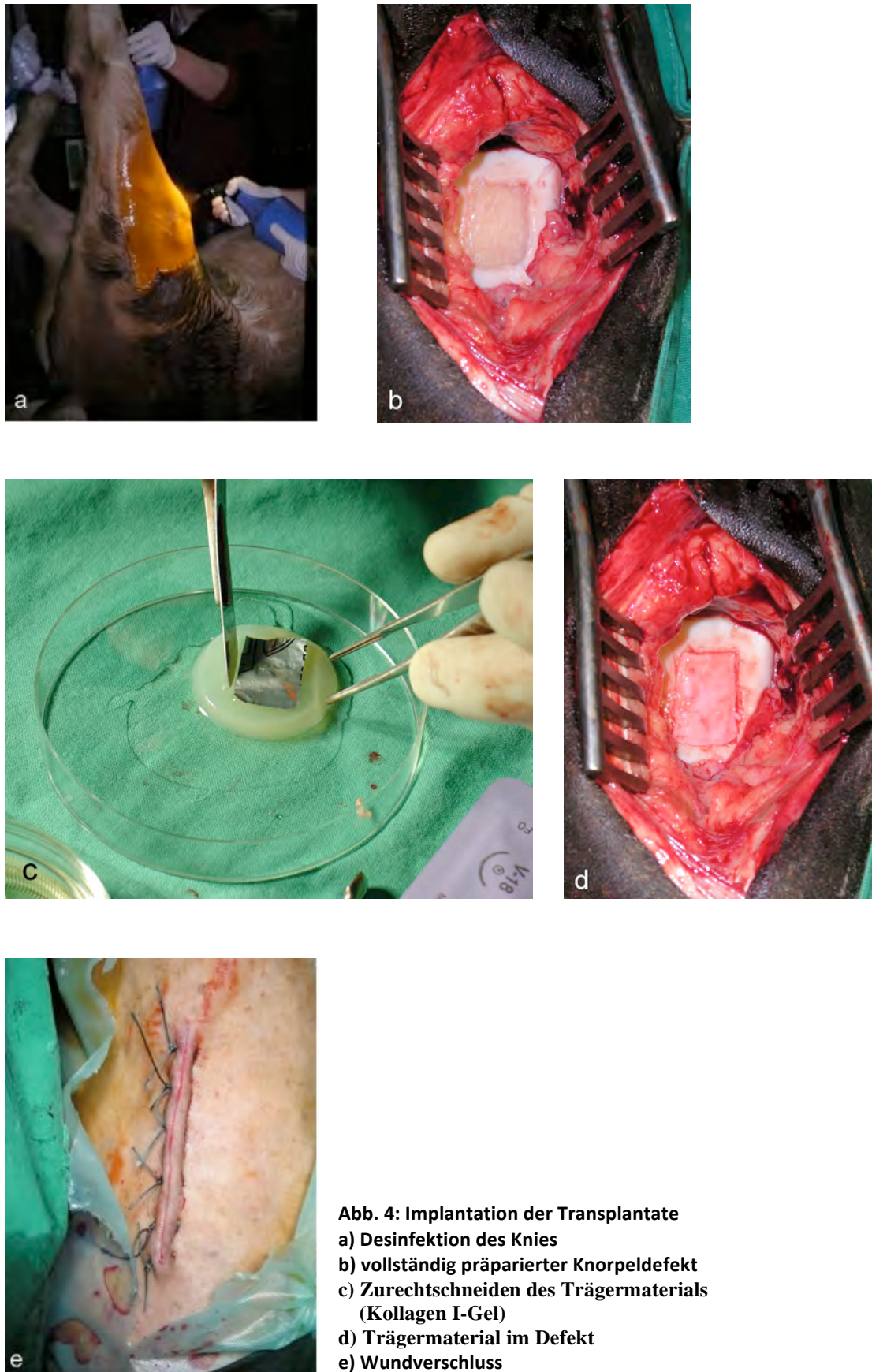
DTK: - Dreidimensionales Trägerfreies Knorpeltransplantat

KI/III: - Kollagen I/III-Membran (Chondro-Gide®)

H: - Hyaluronsäure-Vlies (Hyalograft C®)

H&amp;K: - Hyaluronsäure-Vlies (basal) &amp; Kollagen I/III-Membran (superficial)

KI: - Kollagen I – Gel (CaReS®)



### 3.12 Röntgenkontrolle

Während der ersten postoperativen Woche wurden Röntgenkontrollen in zwei Ebenen an allen operierten Kniegelenken der Pferde durchgeführt und am Tag vor der Euthanasie wiederholt. Ziel der Untersuchung war es, eventuelle radiologische Veränderungen nach Anlage des Knorpeldefektes bzw. stattgehabter ACI sowie im Verlauf zu erfassen.

### 3.13 Ganganalyse

Vor der Euthanasie wurden die Pferde einer Ganganalyse unterzogen, um Auffälligkeiten beim Gangbild, wie z. B. Lahmheit, diagnostizieren zu können.

#### 3.13.1 Sichtbefund

Die Haflinger wurden auf Unregelmäßigkeiten im Bewegungsmuster bei Schrittempo und im Trab untersucht. Der Sichtbefund erfolgte zunächst ohne Vorbelastung der Extremitäten und anschließend nach einer maximalen Beugung der jeweiligen Kniegelenke über 60 Sekunden (Abb. 5). Durch die Beugeprobe können Lahmheiten festgestellt werden, die ohne Vorbelastung auf Anhieb nicht erkennbar sind [64].



Abb. 5: Beugeprobe des linken Kniegelenkes und Videodokumentation des Gangbildes



### **3.13.2 Computerkinematographie**

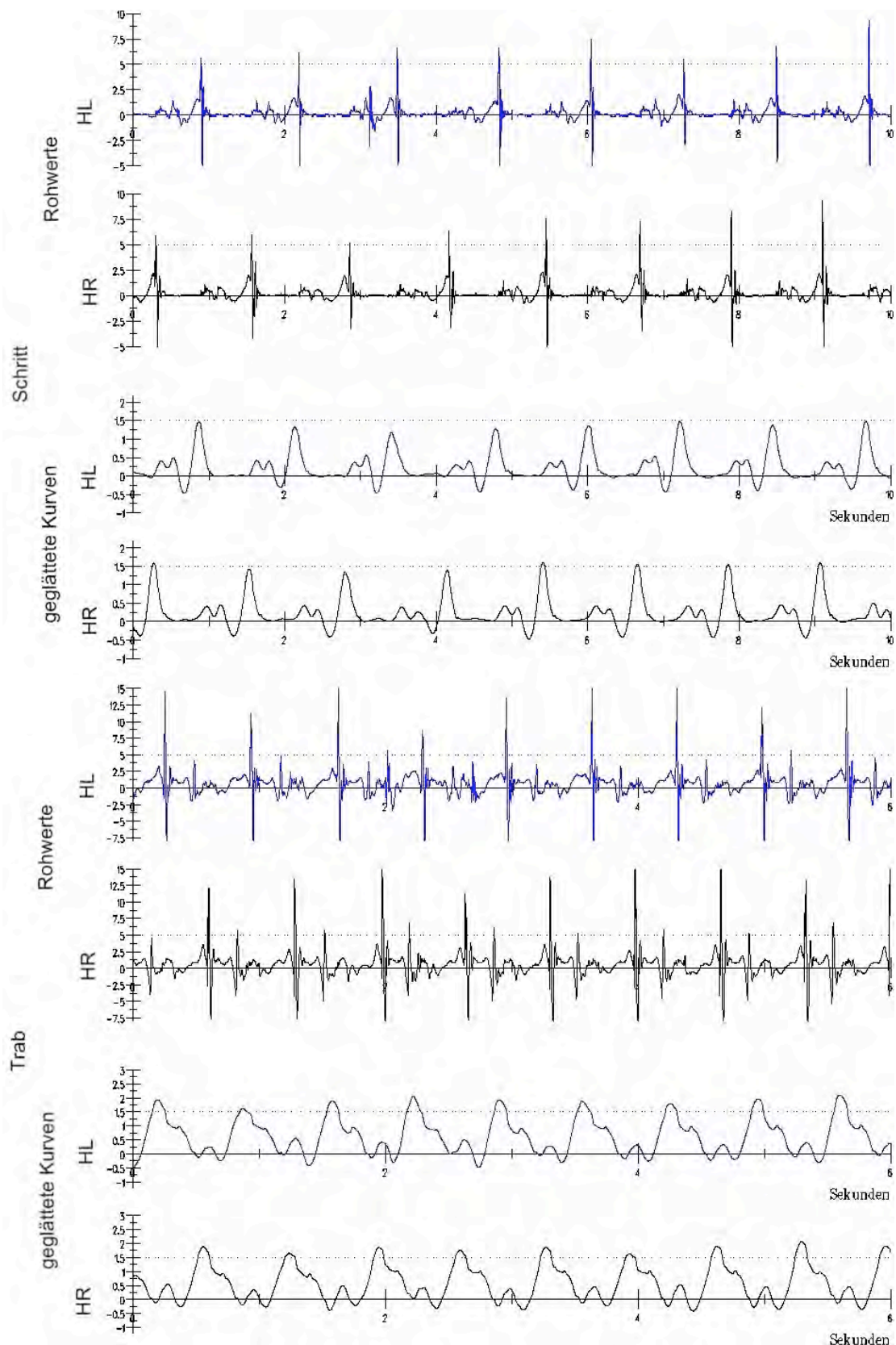
Die Computerkinematographie (CKG) basiert auf Beschleunigungsmessungen an den Extremitäten. Sie erfasst Beinbewegungen und zeichnet diese elektronisch auf. Durch die entstandenen Messwerte (Abb. 6) lassen sich Charakteristika wie Abheben, Aufsetzen und Vorschwingen der Extremitäten ableiten und Unregelmäßigkeiten im Bewegungszyklus, die auf eine Lahmheit hindeuten, diagnostizieren.

Die CKG wurde für alle Pferde auf der gleichen Strecke durchgeführt, welche sie sowohl im Schritt als auch im Trab zurücklegten.

### **3.14 Euthanasie**

18 Monate (Ø 550 (510-564) Tage) nach der ACI wurden die Versuchstiere durch Gabe einer letalen Dosis von Phenobarbital-Natrium i.v. euthanasiert.

Die Euthanasie von Pferd Nr. 12 (H-Gruppe) musste bereits nach 17 Monaten durchgeführt werden, da es an einer chronischen Durchfallerkrankung litt und sich der Allgemeinzustand im Verlauf zunehmend verschlechterte.



**Abb. 6:** Ausschnitt aus einem Computerkinetogramm von Pferd 17

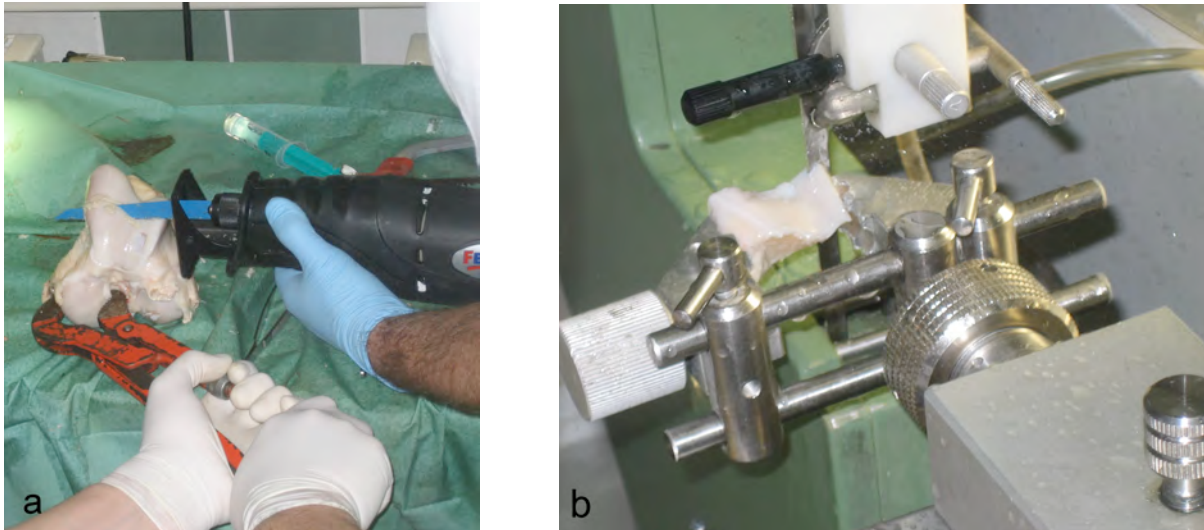
Die Kurven geben die Beschleunigung über die Zeit wieder. Die vier Kurven für Schritt und die vier Kurven für Trab liegen jeweils über derselben Zeitachse.

Kurven (von oben): Schritt hinten links (Rohwerte), Schritt hinten rechts (Rohwerte), Schritt hinten links (geglättete Kurve), Schritt hinten rechts (geglättete Kurve), Trab hinten links (Rohwerte), Trab hinten rechts (Rohwerte), Trab hinten links (geglättete Kurve), Trab hinten rechts (geglättete Kurve).

HL: hinten links, HR: hinten rechts

### 3.15 Probenentnahme

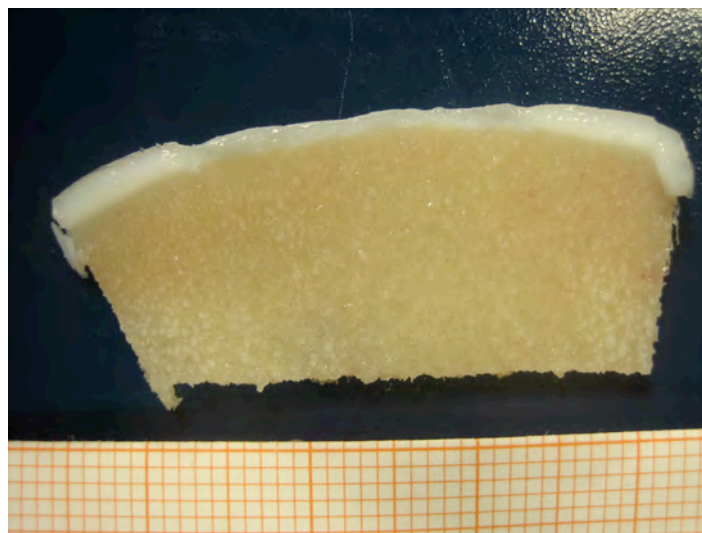
Direkt nach der Tötung der Pferde wurden die Kniegelenke freipräpariert. Nach makroskopischer Beurteilung mit Fotodokumentation folgte die Probenentnahme des transplantierten Areals mit einer elektrischen Säge. Anschließend wurden diese mittels in 2-3 mm dicke Scheiben zerteilt (Abb. 7-8).



**Abb. 7: Präparation für die makroskopische Begutachtung**

**a) Heraustrennen des transplantierten Areals**

**b) Anfertigen von Schnitten der Größe 2-3 mm mit einer elektrischen Standbandsäge**



**Abb. 8: Makroskopischer Befund im Längsschnitt**

### 3.16 ICRS-Score

Makroskopisch wurden die Präparate durch den International Cartilage Repair Society-Score (ICRS-Score) für Knorpeltransplantate nach Brittberg und Peterson (1998) bewertet (Tabelle 4) [22]. Dieser beinhaltet die Befundung der Defektdeckung, der Integration in die angrenzende Knorpelschulter und des makroskopischen Erscheinungsbildes. Anhand dieser Bewertung wird das Regeneratgewebe in 4 Grade eingeteilt. Die Höhe des Regeneratgewebes wurde mittels der Fotodokumentation der angefertigten Längsschnitte geschätzt (Abb. 8).

**Tabelle 4: Makroskopische Beurteilung der Schwere eines Knorpelschadens nach dem ICRS-Score [22]**

<b>ICRS-Score (Makroskopie)</b>		
<b>Merkmal</b>	<b>Bewertungskriterien</b>	<b>Punkte</b>
<b>Grad der Defektdeckung (Höhe des Reparaturgewebes)</b>	Im Niveau des benachbarten Knorpels	4
	Füllung von 75% der Defekttiefe	3
	Füllung von 50% der Defekttiefe	2
	Füllung von 25% der Defekttiefe	1
	Keine Füllung des Defektes	0
<b>Integration in die angrenzende Knorpelschulter</b>	Vollständige Integration in den angrenzenden Knorpel	4
	Demarkierungssaum von < 1mm	3
	¾ des Transplantates sind integriert, ¼ zeigt einen Saum von >1mm	2
	½ des Transplantates sind integriert, ½ zeigt einen Saum von >1mm	1
	Maximal ¼ des Transplantates ist integriert	0
<b>Makroskopisches Erscheinungsbild</b>	Oberfläche eben und intakt	4
	Aufgefaserter Oberfläche	3
	Kleinere verstreute Einrisse oder Aufbrüche	2
	Mehrfache kleinere oder wenige größere Einrisse oder Aufbrüche	1
	Völlige Degeneration des transplantierten Areals	0
<b>Gesamtbeurteilung des Regeneratgewebes</b>	Grad I - normal	12
	Grad II - nahezu normal	8-11
	Grad III - deutliche pathologische Veränderungen	7-4
	Grad IV - schwere pathologische Veränderungen	3-1

### 3.17 Labortechnische Untersuchungen

#### 3.17.1 Fixierung und Einbettung

Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme für 4 Stunden bei 4 °C mit 4 %igem Paraformaldehyd fixiert. Danach erfolgte die sechsmalige Spülung der Präparate mit 0,1 m Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,2 – 7,4).

Nach der Fixation wurden die Präparate zur Herstellung der Paraffinschnitte unter ständigem Bewegen und zweitägigem Lösungswechsel mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) entkalkt.

Dieser Vorgang dauerte je nach Präparatgröße bis zu 6 Wochen. Der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 %, 96 %, 100 %) und Xylol folgte die Einbettung in Paraffin. Schließlich wurde der Präparatblock mit dem Rotationsmikrotom RM2155 in 3-5 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese Schnitte dienten der histologischen und immunhistochemischen Beurteilung der Präparate.

Zur Einbettung in Technovit 9100neu® wurden die Präparate sechsmal mit 0,1 m Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,2 – 7,4) gespült. Anschließend erfolgten die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und das Verbringen der Präparate in Xylol als Intermedium. Die Präparate wurden zunächst mit Xylol und Technovit (1:1), schließlich mit stabilisierter und entstabilisierter Basislösung präinfiltriert. Nachfolgend konnten sie bei -4 °C für 48 Stunden polymerisieren.

Von den Präparaten wurden anschließend 15-30 µm dünne Knochenschliffe mit der Dünnschlifftechnik nach Donath angefertigt [41]. Diese Schliffe zog man ebenfalls zur lichtmikroskopischen Beurteilung heran.

### **3.17.2 Haematoxylin-Eosin-Färbung**

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) handelt es sich um die gebräuchlichste Übersichtsfärbung. Hierbei werden der Zellkern, das Zytoplasma und vor allem die kollagenen Fasern der extrazellulären Matrix (ECM) dargestellt. Hämatoxylin und Eosin sind Farbstoffe, die nacheinander angeboten werden. Hämatoxylin färbt den sauren Zellkern blauviolett. Die Zytoplasmaanteile sowie kollagene Fasern erscheinen nach Gabe von Eosin rot [25, 144]. Die Färbung dient vor allem zum Nachweis und der Verteilung der Chondrozyten im untersuchten Präparat.

Vor der HE-Färbung wurden die Technovit-Schliffe in 2-Methoxyethylacetat (MEA) entplastet. Das bedeutet, dass der Kunststoff aus dem fixierten Gewebe gelöst wird, um es so für die Aufnahme des Farbstoffes zugänglich zu machen. Anschließend wurden sie in reinem Aceton sowie in einer Aceton-Aqua dest.-Mischung (1:1) und in purem Aqua dest. rehydriert. Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und schließlich in einer absteigenden Alkoholreihe ebenfalls rehydriert.

Die Anfärbung der Präparate erfolgte zunächst mit frisch gefilterter Mayers Häkalaunlösung für 25-30 Sekunden, um sie nach Spülung mit Aqua dest. unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten zu bläuen. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit wasserlöslichem Eosin G für 13-15 Sekunden gefärbt und anschließend mit Aqua dest. gespült. Nach

Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 % und 100 %) und Xylol wurden sie mit Depex® eingedeckelt.

### 3.17.3 Alcian-Färbung

Die Färbung mit Alcianblau diene der Darstellung von Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen, welche gehäuft in Knorpelgewebe vorkommen [140]. Zunächst wurden die Präparate (Paraffin-Schnitte und Technovit-Schliffe) mit MEA entplastet und mit Aceton und Aqua dest. rehydriert. Nach 3-minütiger Spülung in 3 %iger Essigsäure erfolgte die Färbung mit Alcianblau für 30 Minuten. Danach wurden die Präparate für 2 Minuten mit Aqua dest. und anschließend für 10 Minuten mit 1 %iger Perjodsäure gespült. Nun konnten die Präparate 10 Minuten in Schiffs Reagenz gelagert und anschließend für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült werden. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämalaun für 3 Minuten. Nach dem Bläuen in fließendem Leitungswasser über 10 Minuten wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 % und 100 %) und 2 Xylolbädern entwässert und anschließend mit Depex® eingedeckelt.

### 3.17.4 Safranin-O-Färbung

Die Safranin-O-Färbung ist eine Standardfärbung, die zur selektiven Darstellung von Glykosaminoglykanen des Knorpelgewebes verwendet wird. Der kationische Farbstoff bindet an die reaktiven Carboxyl- und Sulfonsäuregruppen der Glykosaminoglykane der Knorpelmatrix. Die Farbintensität ist proportional zum Gehalt an Glykosaminoglykanen der Matrix. Das Safranin-O wird in seine orthochrome Form transferiert, das heißt, es bindet sich nur an die Gewebepolyanionen und nicht an Kollagen. Die Färbung mit Safranin-O kann als semiquantitative histochemische Methode für die Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes im Knorpelgewebe angesehen werden [140, 144].

Vor der Safranin-O-Färbung wurden die Präparate (Paraffin-Schnitte) zunächst entparaffiniert und anschließend mit Eisenhämatoxylin nach Weigert gefärbt. Die Weigert A-Lösung besteht aus 10 g Hämatoxylin in 1 Liter 96 %igen Alkohol, die Weigert B-Lösung aus 15 g wasserfreiem Eisen(III)chlorid in 1 Liter Aqua dest. und 10 ml 25 %iges KCl. Die Färbung erfolgte mit einem Verhältnis von 1:1 beider Weigert-Lösungen für 5 Minuten. Anschließend wurden die Präparate mit Aqua dest. und fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gespült, danach für 2-3 Minuten mit 0,1 % Lichtgrün behandelt und darauffolgend mit 1 %iger

Essigsäure gespült. Im nächsten Schritt erfolgte die vierminütige Färbung der Schnitte mit 0,1 % Safranin-O und danach die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol. Am Ende wurden die Präparate mit Depex<sup>®</sup> eingedeckelt.

### 3.17.5 Toluidin-Färbung

Toluidinblau ist ein basischer Farbstoff, der selektiv an negativ geladene Teilchen bindet und diese blau darstellt. Beim Knorpelgewebe nutzt man die Basophilie der in der Knorpelgrundsubstanz enthaltenen Chondroitinschwefelsäure. Diese ist zu einem polymeren Verband zusammengefasst. Ihre sauren Sulfatgruppen lassen sich durch ihre dichte und regelmäßige Anordnung mit Hilfe von Toluidinblau gut darstellen [25, 144].

Zur Färbung mit Toluidinblau wurden die Technovit-Schliffe zunächst mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> angeätzt, danach gründlich mit Wasser abgespült, getrocknet und anschließend 15 Minuten mit Toluidinblau gefärbt. Es folgte das erneute Abspülen und Abtrocknen, danach das Eindeckeln mit Technovit 7200 und die Polymerisation unter Blaulicht.

### 3.17.6 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden gegen humanes Gewebe gerichtete Antikörper verwendet, die nachweislich mit tierischem Material kreuzreagieren. Zur Reaktion mit Kollagen I kam ein von Kaninchen stammender polyklonaler Antikörper zum Einsatz. Der Nachweis von Kollagen II erfolgte durch einen 1:100 verdünnten monoklonalen Antikörper aus Mäusen.

Die Präparate wurden mit Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und mit Tris Buffered Saline (TBS) mit 0,025 % TritonX 100 gespült. Nach einer Vorbehandlung mit Hylase und 5facher Pronase wurde die endogene Phosphatase mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockiert. Mit dem jeweiligen Primärantikörper wurde das Gemisch nun über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag folgte die Zugabe der Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erfolgter Spülung wurde das Präparat in einem Streptavidin-Biotin-Komplex bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert und danach zweimal mit TBS und einmal mit Aqua dest. gespült. Die Visualisierung der positiven Reaktion fand mit dem Chromogen Nova Red<sup>®</sup> für 5 Minuten statt. Die Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin vorgenommen, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Nach erneutem Spülen mit Leitungswasser und Aqua dest. wurde das Präparat sowohl mit einer aufsteigenden

Alkoholreihe mit 70 %, 98 % und 100 % als auch zweimal mit Xylol entwässert. Anschließend wurde das Präparat erneut mit Depex<sup>®</sup> eingedeckelt.

### **3.18 O`Driscoll-Score**

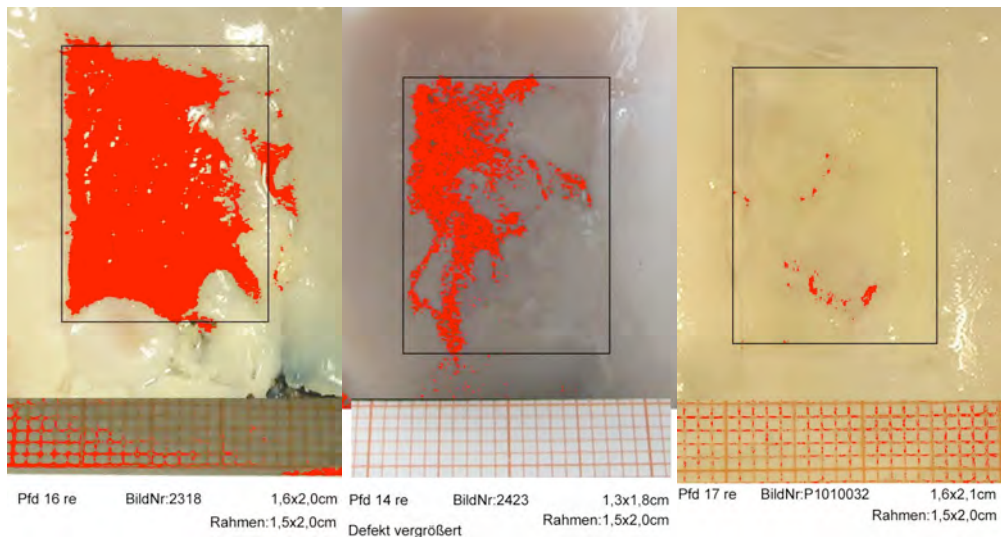
Als Scoring-System zur Beurteilung des neu entstandenen Regeneratgewebes verwendete man den O`Driscoll-Score (Tabelle 5). Dieser schließt alle für diese Studie relevanten Kriterien mit ein. Dazu zählen die Natur des dominierenden Gewebes, strukturelle Eigenschaften, degenerative zelluläre Prozesse und Veränderungen im angrenzenden Knorpel. Zusätzlich beinhaltet der O`Driscoll-Score Angaben über die Zellmorphologie.

Je nach Eigenschaft des Gewebes und der Zellen wird ein bestimmter Punktwert (Score) vergeben. Der höchste Wert von 24 wird erreicht, wenn kein Unterschied zu nativem hyalinem Knorpel besteht.

### **3.19 Graphische Auswertung der Defektfüllungen**

Bevor die Kniegelenke für die histologischen Untersuchungen aufgearbeitet wurden, erfolgte begleitend zur Fotodokumentation eine quantitative Auswertung des mit Regeneratgewebe gedeckten Anteils des Defekts. Als Programm zur Messung wurde Image-Pro Plus Version 4.5.1 (Media Cybermetrics) verwendet. Mit diesem Programm ist es möglich, unterschiedliche Farbintensitäten zu bestimmen. Die Stellen, die nicht dem Regeneratgewebe entsprechen, wurden rot markiert (Abb. 9). Die so entstandene rote Fläche wurde berechnet und in Relation zum gesamten Regenerat prozentual angegeben. Über die Dreidimensionalität des neu entstandenen Gewebes erhält man auf diese Weise keine Erkenntnisse, da nur beurteilt werden kann, ob noch subchondraler Knochen zu sehen ist oder nicht. Die Farbintensitätsmessungen wurden zweimal je Präparat durch 2 bzw. 3 Personen durchgeführt. Danach wurde der Mittelwert aus den Messergebnissen der jeweiligen Präparate bestimmt und dokumentiert.





**Abb. 9: Graphische Auswertung der Defektfüllungen**

Unterschiedlich stark gefüllte Defekte. Der nicht gefüllte Bereich ist rot markiert. Das Regenerat ist eingerahmt (Original-Rahmengröße 1,5 cm x 2,0 cm, entsprechend der Defektgröße).

### 3.20 Statistische Tests

Als statistische Tests wurden der ANOVA-Test und der Chi-Quadrat-Test ( $X^2$ -Test) verwendet.

#### 3.20.1 ANOVA-Test

Bei einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Analysis of Variance) wird der Einfluss verschiedener Ausprägungen einer unabhängigen Variablen (Faktor) auf eine abhängige Variable untersucht.

Mit den Prüfgrößen der „einfachen Varianzanalyse“ wird getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. So kann ermittelt werden, ob sich die Gruppen signifikant voneinander unterscheiden.

Zunächst ermittelt man den Gesamtmittelwert und die Gesamtvarianz. Um nun auszurechnen, welche Varianz allein auf die Ausprägungen des Faktors zurückgeht, stellt man seine Daten gewissermaßen für einen Moment „ideal“ um. Allen Messwerten innerhalb einer Faktorstufe wird der jeweilige Mittelwert zugewiesen. Teilt man die Einzelvarianz durch die Gesamtvarianz, erhält man den relativen Anteil der auf den Faktor zurückzuführenden Varianz.

Tabelle 5: O`Driscoll-Score [107]

O`Driscoll Score	
Gewebsbeschaffenheit	Punkte
<b>Zellmorphologie</b>	
hyaliner Knorpel	4
überwiegend hyaliner Knorpel	3
hyaliner Knorpel und Faserknorpel	2
überwiegend Faserknorpel	1
überwiegend kein Knorpelgewebe	0
<b>Safranin-O Färbung der Matrix</b>	
normal oder fast normal	3
mäßig	2
wenig	1
keine	0
Gewebsstruktur	
<b>Oberflächenbeschaffenheit</b>	
glatt und intakt	3
oberflächliche horizontale Einrisse	2
Einrisse – 25-100% der Knorpelschicht	1
Hochgradige Gewebsunterbrechungen	0
<b>Integrität der Struktur</b>	
Normal	2
Leichte Unterbrechungen, einschl. Zystenbildung	1
Schwere Unterbrechungen	0
<b>Knorpeldicke</b>	
100% des benachbarten nativen Knorpels	2
50-100% des benachbarten nativen Knorpels	1
0-50% des benachbarten nativen Knorpels	0
<b>Verbindung zum benachbarten nativen Knorpel</b>	
beiderseitig intakte Verbindung	2
einseitig intakte Verbindung oder beiderseitig partielle Verbindung	1
keine Verbindung	0
Freiheit von zellulären degenerativen Veränderungen	
<b>Zelldichte</b>	
normale Zelldichte	3
leichte Zellarmut	2
mäßige Zellarmut	1
ausgeprägte Zellarmut	0
<b>Clusterbildung der Chondrozyten</b>	
keine Cluster	2
<25% der Zellen bilden Cluster	1
25-100% der Zellen bilden Cluster	0
<b>Freiheit von degenerativen Veränderungen des benachbarten nativen Knorpels</b>	
Normale Zelldichte, keine Cluster, normale Anfärbbarkeit	3
Normale Zelldichte, leichte Clusterbildung, mäßige Anfärbbarkeit	2
Leichte Zellarmut, schlechte Anfärbbarkeit	1
Ausgeprägte Zellarmut, schlechte oder keine Anfärbbarkeit	0

Die Nullhypothese einer einfaktoriellen Varianzanalyse besagt, dass kein Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen besteht. Die Alternativhypothese hingegen besagt, dass mindestens zwei Mittelwerte variieren. Wird die Nullhypothese verworfen, bedeutet dies, dass mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau) mindestens zwei Ausprägungen einen bedeutsamen Unterschied aufweisen.

### 3.20.2 Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test)

Zum Vergleich von Häufigkeitsverteilungen wird der Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test) durchgeführt. Er hängt davon ab, was als abhängige und was als unabhängige Variable angesehen wird.

Vereinfacht kann das Verfahren folgendermaßen beschrieben werden: Man nimmt zum Beispiel zwei Teilgruppen mit je zwei Kategorien. Daraus resultieren dann vier Teilgruppen, für die man die beobachteten Häufigkeiten in eine Kreuztabelle einträgt. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Häufigkeit, die zu erwarten wäre, wenn die beiden Merkmale völlig unabhängig voneinander wären. Für jedes der vier Felder wird die Differenz aus beobachteten und erwarteten Häufigkeiten gebildet, quadriert und durch die erwartete Häufigkeit geteilt. Der Chi-Quadrat-Wert wird dann durch die Summe der entsprechenden Werte für alle vier Zellen gebildet.

Für jeden dieser Chi-Quadrat-Werte lässt sich die entsprechende Signifikanz  $p$  ableiten ( $\chi^2=3,841$  entspricht  $p=0,05$ ,  $\chi^2=6,63$  entspricht  $p=0,01$ ). Es ist festgelegt, dass ein signifikanter Unterschied bei einem  $p$ -Wert  $<0,05$  und ein sehr signifikanter Unterschied bei einem  $p$ -Wert  $<0,01$  besteht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinischer Verlauf

Der postoperative Verlauf nach der arthroskopischen Knorpelzellentnahme am linken Talus der Pferde stellte sich komplikationslos dar. Die Pferde belasteten die operierte Extremität sofort und ließen unter analgetischer Medikation keine relevanten Schmerzäußerungen erkennen.

Nach Implantation der Transplantate zeigten sich bei 5 Operationswunden vorübergehende oberflächliche Wundheilungsstörungen. Im postoperativen Verlauf war bei Pferd Nr. 9 (KI/III-Gruppe) linksseitig eine schmerzhafte intraartikuläre Ergussbildung beobachtet worden. In einer anschließenden Gelenkpunktion wurde ein Infekt mit  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken diagnostiziert. Durch eine arthroskopische Lavage, bei der das Implantat unverändert im Defekt zu erkennen war, und mehrfache Gelenkspülungen konnte in der Folge Infektfreiheit erreicht werden. Unter der Gabe von Nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAP) für durchschnittlich 14 (8-26) Tage belasteten und bewegten die Pferde ihre beiden operierten Extremitäten frei und ohne bedeutende Schmerzäußerungen.

### 4.2 Ganganalyse

Vor der Euthanasie unterzog man die Pferde einer Ganganalyse. Neben der Adspektion sowie einer tierärztlichen klinischen Beurteilung des Gangbildes nach einer Beugeprobe wurde auch eine Ganganalyse mit Computerkinematographie (CKG) durchgeführt (Tabelle 6).

Die Gangmuster der Pferde waren bei 12 von 16 Pferden unregelmäßig, ließen aber keine deutlichen Anzeichen einer Lahmheit erkennen.

Abweichungen bezüglich der Differenzen der Belastungsdauer der beiden Hinterbeine zeigten sich bei 5 Pferden (Pferde Nr. 6, 7, 8, 13 und 16). Abweichungen  $>10\%$  in der Differenz der Beschleunigungen beim Aufsetzen der Hinterbeine wurden bei 3 Pferden (Pferde Nr. 8, 13 und 17) gemessen. Bei 5 Pferden kam es zu einer Phasenverschiebung als Maß für das taktreine Aufsetzen der Hinterbeine (Pferde Nr. 6, 7, 8, 13 und 17). Die tabellierten Werte (Tabelle 6) für die Phasenverschiebung geben an, um welchen Zyklusanteil das rechte auf das linke Hinterbein folgt. Eine verkürzte Phase  $>2\%$  wird als pathologisch angenommen.

In Zusammenschau der erhobenen Adspektion sowie der computerkinematographisch gemessenen Werte zeigten 7 Pferde ein pathologisches Gangbild. 2 Pferde erfüllten hierbei ein Schonungskriterium (Pferde Nr. 11 und 16), bei 4 Pferden wurden zwei

Schonungskriterien erfüllt (Pferde Nr. 6, 7, 13 und 17) und Pferd Nr. 8 erfüllte alle drei Schonungskriterien.

Fast in jeder Versuchsgruppe traten Asymmetrien in den Bewegungsmustern auf. Eine Ausnahme stellen die mit Kollagen I-Transplantaten versorgten Pferde dar. Hier wurden keine Anzeichen einer Lahmheit gefunden.

Für drei der lahmen Pferde (Pferde Nr. 8, 16 und 17) lagen Messergebnisse von Bewegungsmustern präoperativ vor. Ein Vergleich der Daten vor der OP mit den postoperativen Messergebnissen zeigt, dass Pferd Nr. 17 in sein vorheriges Bewegungsmuster einschließlich der individuentypischen Abweichungen fällt und es somit nicht in die Gruppe der Pferde mit postoperativer Lahmheit fällt. Für die beiden anderen Fälle lässt sich eine postoperative Lahmheit diagnostizieren.

### 4.3 Radiologische Befundung

Die Röntgenkontrollen unmittelbar postoperativ sowie am Tage vor der Euthanasie zeigten bei keinem Tier radiologische Hinweise auf stattfindende Umbauvorgänge. Insbesondere konnten am subchondralen Knochen keine Auffälligkeiten diagnostiziert werden. Ebenso fanden sich keine Hinweise auf degenerative Veränderungen oder freie Gelenkkörper (Abb. 10).

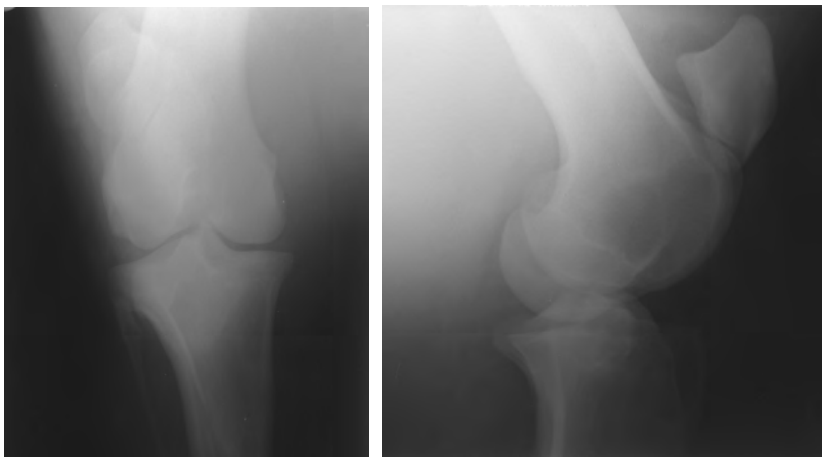


Abb. 10: Radiologischer Befund am Beispiel des rechten Kniegelenks von Pferd Nr. 18 in 2 Ebenen

Tabelle 6: Auswertung der Ganganalyse

Implantat	Pferde- nummer	Seite	Adspektion	Beugeprobe	BD HR bzw. HL (%BED)	Abweichung (paarig)	Aufsetzen HR bzw. HL (G)	Abweichung >10%	Phasen- verschiebung (li→re)	Befund
DTK	6	Re	-	-	42,1	li 3,5	2,23	-	47,2	li +
		Li	(+)	(+)	39,2		2,08			
	8	Re	-	-	45,9	re 3,5	2,55	re 0,26	52,1	re ++
		Li	+	++	49,3		2,81			
	10	Re	-	-	43,3	-	2,44	-	50,9	-
		Li	-	-	45,3		2,27			
KI/III	7	Re	(+)	(+)	43,7	re 4,4	1,88	-	54,9	re +
		Li	-	-	48,0		1,99			
	9	Re	-	-	kW	x	2,37	-	51,4	-
		Li	+(+)	++	38,1		2,35			
	11	Re	+	x	43,6	-	1,88	-	52,1	re (+)
		Li	++	x	43,6		1,82			
	21	Re	-	x	41,8	-	2,53	-	50,7	-
		Li	-	x	41,4		2,44			
H	12	Re	-	-	45,8	-	1,90	-	48,9	-
		Li	-	-	43,3		1,78			
	13	Re	-	-	42,4	re 2,8	1,48	re 0,31	51,6	re +
		Li	-	-	44,0		1,79			
	14	Re	-	-	40,4	-	1,84	-	51,1	-
		Li	-	-	42,1		2,03			
KI/III & H	15	Re	-	-	45,5	-	2,51	-	49,3	-
		Li	-	-	46,2		2,70			
	16	Re	(+)	+	39,8	re 4,9	2,79	-	50,4	re (+)
		Li	-	-	44,8		2,93			
	17	Re	-	-	44,4	-	1,95	li 0,33	47,0	li +
		Li	-	-	42,2		1,62			
KI	18	Re	-	-	43,3	-	2,48	-	51,4	-
		Li	-	-	44,7		2,67			
	19	Re	-	x	46,9	-	2,49	-	48,9	-
		Li	-	x	46,3		2,55			
	20	Re	-	-	45,1	-	2,37	-	49,1	-
		Li	-	-	43,3		2,54			

**BD HR/HL:** Belastungsdauer der Gliedmaße hinten rechts (HR) oder links (HL) in % von der Bewegungseinheitsdauer. Die tabellierten Werte sind Medianwerte der Messreihen. Wird das Bein z.B. im Mittel der Messzyklen 40 % belastet (gestützt) und 60 % entlastet (geschwungen), so beträgt der tabellierte Wert 40,0. Reduzierte Werte sprechen für eine Schonung des Beines.

**Abweichung (paarig):** Differenz der Belastungsdauern links und rechts. Bei dem zu Grunde liegenden Wert sind nicht die tabellierten Medianwerte voneinander subtrahiert worden, sondern die Belastungsdauern jedes einzelnen Zyklus (paarig). Aus den erhaltenen Differenzen wurde der Median errechnet.

**Aufsetzen HR/HL (G):** Beschleunigung der Extremitäten hinten rechts (HR) oder links (HL) in Vielfachem der Erdgravitation (G). Die Beschleunigungswerte sind aus den geglätteten Kurven bestimmt und entsprechen dem Maß für die Belastung beim Aufsetzen. Reduzierte Werte sprechen für eine Schonung des Beines.

**Abw. >10 %:** Differenz der Beschleunigungen beim Aufsetzen, sofern diese über 10 % des Beschleunigungswertes liegen. Geringere Abweichungen wurden nicht berücksichtigt, da sie in der Regel unbedenklich sind.

**Phasenverschiebung (li→re):** Maß für das „taktreine“ Aufsetzen der Hinterbeine. In der idealen Bewegung ist der Wert für die Phasenverschiebung 50 % (% von der Dauer einer Bewegungseinheit/ Zyklus). Das bedeutet, dass das Aufsetzen der Beckengliedmaßen exakt um einen halben Bewegungszyklus verschoben erfolgt. Die tabellierten Werte geben an, um welchen Zyklusanteil das rechte auf das linke Hinterbein folgt. Das heißt: bei Werten über 50 % folgt das rechte Bein verspätet, bei Werten unter 50 % folgt es verfrüht. Hier wurden Abweichungen >2 % als auffällig gelistet.

**Befund:** Insgesamt wurden 3 Schonungskriterien aus einer Abweichung in der Symmetrie verwendet (Verkürzte Belastungsdauer, schwächeres Aufsetzen, zeitverschobenes Aufsetzen). Zur Beurteilung des Lahmheitsgrades wurde folgendes Verfahren verwendet: (+) Erfüllung eines Schonungskriteriums, + Erfüllung von zwei Schonungskriterien, ++ Erfüllung aller drei Schonungskriterien.

x: kein Wert vorhanden

#### 4.4 Graphische Auswertung der Defektfüllungen

Analog zur makroskopischen Begutachtung zeigt auch die graphische Auswertung der Defektfüllungen keine signifikanten Unterschiede unter den Präparaten.

Dem Mittelwert der mit ACI *und* Trägermaterial versorgten Defekte von 75,9 % (66,0-86,8) steht ein Füllungsgrad von 86,5 % der mit DTK versorgten Gruppe gegenüber. Innerhalb der DTK-Gruppe ermittelte man einen Durchschnittswert der Defektfüllung von 87,6 % (62,9-99,4) bei den Defekten der Größe mit dem Durchmesser von ca. 1 cm und von 84,4 % (75,1-93,7) bei den Defekten der Größe 1,0 cm x 1,5 cm.

**Tabelle 7: Auswertung der Grade der Defektfüllungen (Einzelwerte und Prozentangaben für die jeweilige Implantatgruppe)**

Implantat	Pferdenummer	Seite Kniegelenke	Füllungsgrad der Defekte in %	Durchschnittlicher Füllungsgrad der Implantatgruppe in %	Durchschnittlicher Füllungsgrad der DTK bzw. Trägermaterialien-Gruppe in %
DTK	6	Re	75,1	86,5	86,5
	6	Li	94,1		
	8	Re	93,7		
	8	Li	99,4		
	10	Re	62,9		
	10	Li	93,9		
Kollagen I/III	7	Re	52,8	70,3	75,9
	9	Re	60,7		
	11	Re	61,5		
	11	Li	99,8		
	21	Re	68,5		
	21	Li	72,1		
Hyaluronsäure	12	Re	70,2	82,5	
	12	Li	90,9		
	13	Re	85,3		
	13	Li	88,1		
	14	Re	72,6		
	14	Li	87,9		
Kollagen I/III & Hyaluronsäure	15	Re	91,6	86,8	
	15	Li	81,7		
	16	Li	80,8		
	17	Re	99,6		
	17	Li	86,2		
Kollagen I	18	Re	82,5	66	
	18	Li	63,9		
	19	Re	53,4		
	19	Li	90,5		
	20	Re	42,1		
	20	Li	63,3		

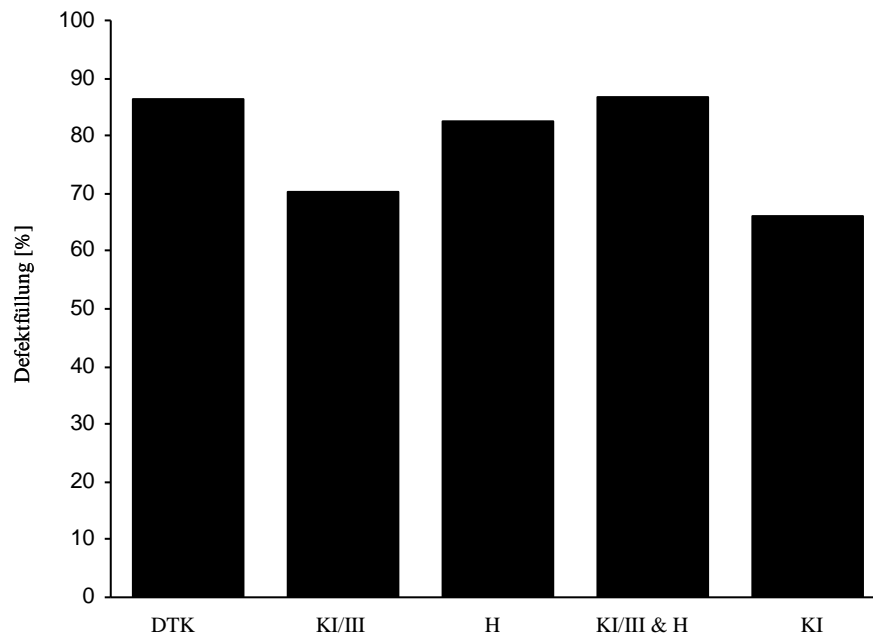


Diagramm 1: Säulendiagramm zur Darstellung der Defektfüllung in Prozent

## 4.5 Regeneratgewebe

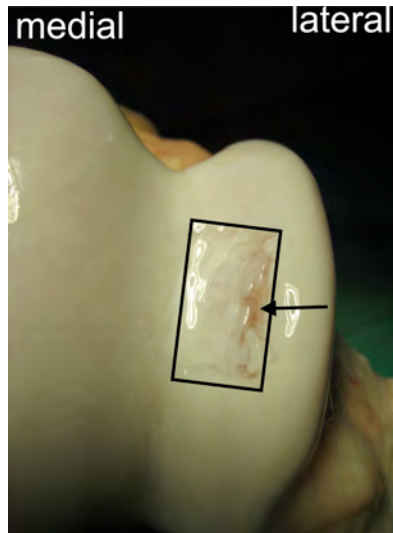
### Makroskopie

Der Versuch liefert insgesamt sehr heterogene Ergebnisse in allen Transplantatgruppen. Einerseits zeigen sich bei allen Transplantaten komplette Defektfüllungen, andererseits scheinen sich besonders im latero-kranialen Bereich Transplantate herauszulösen, während das Regeneratgewebe im medio-kaudalen Teil die Höhe des nativen angrenzenden Knorpels in der Regel erreicht (Abb. 11). Weiterhin scheint die Oberfläche bei der näheren Betrachtung häufig aufgefasert zu sein. Die feste Konsistenz des nativen Knorpels wird durch das Regeneratgewebe nicht erreicht. Bei der Bewertung mit dem ICRS-Score ergaben sich zwischen den einzelnen Transplantatgruppen keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ) (Tab. 8).

Bei der elektronischen Auswertung bezüglich der Defektfüllungen mittels Bildbearbeitungsprogramm zeigt sich ein höherer Füllungsgrad der mit dreidimensionalem trägerfreien Konstrukt (DTK) versorgten Gruppe (Ø 86,5 %). Dem gegenüber steht die mit Trägermaterial (Kollagen I, Kollagen I/III, Hyaluronsäure und die Kombination aus letzteren beiden) versorgte Gruppe mit einer durchschnittlichen Defektfüllung von 75,9 %.

Zur übersichtlicheren Darstellung der Ergebnisse wurden im Folgenden für jedes Implantat repräsentativ ausgewählte Bilder stellvertretend für das jeweilige Verfahren gewählt.





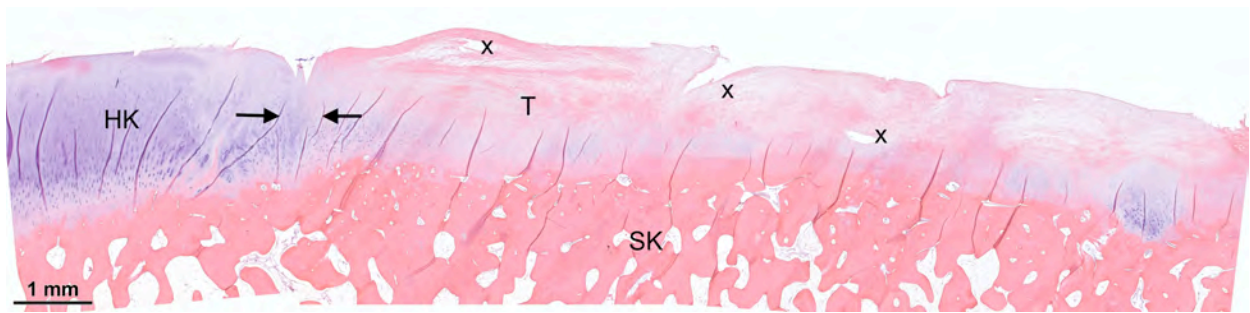
**Abb. 11: Makroskopisches Beispielbild nach MACI (Pferd 14 li, Hyaluronsäure-Vlies)**  
Das Defektareal ist durch ein Rechteck markiert. Lateral zeigen sich Füllungslücken (←).

### Mikroskopie und Immunhistochemie

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass innerhalb der Gruppe der matrixassoziierten Knorpelzelltransplantate recht ähnliche Ergebnisse erzielt wurden (Abb. 12). Den Regeneraten gelingt größtenteils die Integration in das umliegende Gewebe, das heißt an den benachbarten ortsständigen hyalinen Knorpel und den subchondralen Knochen. Bei intakter Mineralisierungszone ist das Füllgewebe jedoch teilweise vom subchondralen Knochen abgehoben. Die Höhe der Knorpelschultern wird insbesondere in den medialen Bereichen fast immer erreicht. Bezüglich der Zellmorphologie zeigen sich in basaleren Abschnitten Zellen vom Chondrozyten-Phänotyp. Superfizial sind diese nur selten anzutreffen. Hier dominiert faserreiches Bindegewebe mit reichlich spindelförmigen Zellen vom Fibrozyten-Phänotyp. Die oberflächlichen Fasern sind überwiegend horizontal verlaufend. Die Oberfläche wirkt daher glatt und einheitlich. In einigen Fällen lassen sich aber auch erhebliche Auffaserungen erkennen. Vereinzelt zeigen sich vertikale Risse in der angrenzenden Knorpelschulter. Stellenweise wirkt der Knochen unterhalb des Defektareals durch An- und Abbauprozesse wellig verändert.

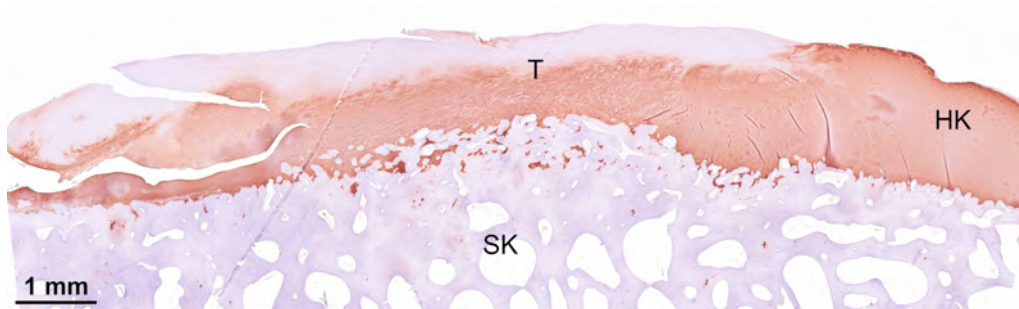
In der Immunhistochemie lässt sich eine Zweischichtigkeit der Trägermaterialien-Transplantate feststellen. Während die apikale Seite stets mit dem Kollagen I-Antikörper reagiert, findet sich knochennah das besonders im Knorpelgewebe vorkommende Kollagen II. Jedes Präparat weist jedoch starke Unterschiede zum hyalinen Knorpel auf (Abb. 13).

Auch die dreidimensionalen trägerfreien Konstrukte (DTK) zeigen ein vergleichbares Bild.



**Abb. 12: Histologisches Beispielbild nach MACI (Pferd 17 re, H&KI/III)**

HE-gefärbtes Präparat. Im linken ¼ stellt sich der ortsständige hyaline Knorpel (HK) dar. Die verbleibenden ¾ dieses Ausschnittsbildes werden durch das Transplantat eingenommen (T), das eine gute Verbindung zum subchondralen Knochen (SK) und Nachbarknorpel (→ ←) eingeht, jedoch durch Rissbildungen stellenweise unterbrochen ist (x). Auf der Oberfläche zeigen sich Einkerbungen.



**Abb. 13: Immunhistochemisches Beispielbild nach MACI (Pferd 20 re, Kollagen I-Gel)**

Das Transplantat (T) zeigt eine Zweischichtigkeit. Der hyaline Knorpel (HK) und der basale Anteil des Transplantats reagieren mit dem Kollagen II-Antikörper, während der gelenknahe Bereich des Regenerats und der subchondrale Knochen (SK) nicht reagieren.

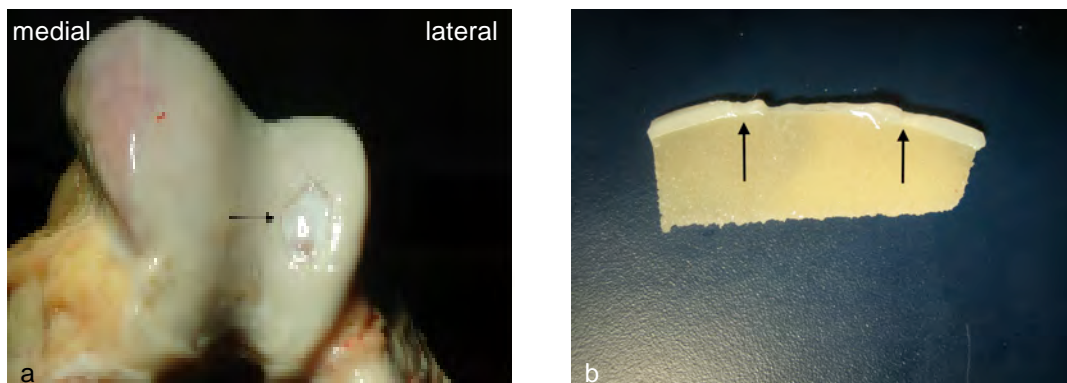
Die Bewertung des Regeneratgewebes und des angrenzenden Knorpels erfolgt nach dem O'Driscoll-Score. Hier zeigen sich ebenfalls nur geringgradige Unterschiede zwischen den verschiedenen Transplantat-Gruppen (Durchschnittswerte zwischen 13,0 und 14,7 bei einem maximal zu erreichenden Wert von 24).

### 4.5.1 Dreidimensionales trägerfreies Konstrukt (DTK)

#### Makroskopie

Verfahrensbedingt wurden die druckkultivierten Knorpelzellen in Defekte unterschiedlicher Größe eingebracht. Drei Kniegelenke (Pferd Nr. 6 links, Pferd Nr. 8 rechts, Pferd Nr. 10 rechts) wurden mit der Implantatgröße von 1,0 cm x 1,5 cm versorgt. Die anderen Kniegelenke (Pferd Nr. 6 rechts, Pferd Nr. 8 links, Pferd Nr. 10 links) erhielten jeweils zwei Implantate mit einem Durchmesser von 1,0 cm. Die beiden kleineren Implantate wurden bei der Bewertung des Regeneratgewebes zusammengefasst.

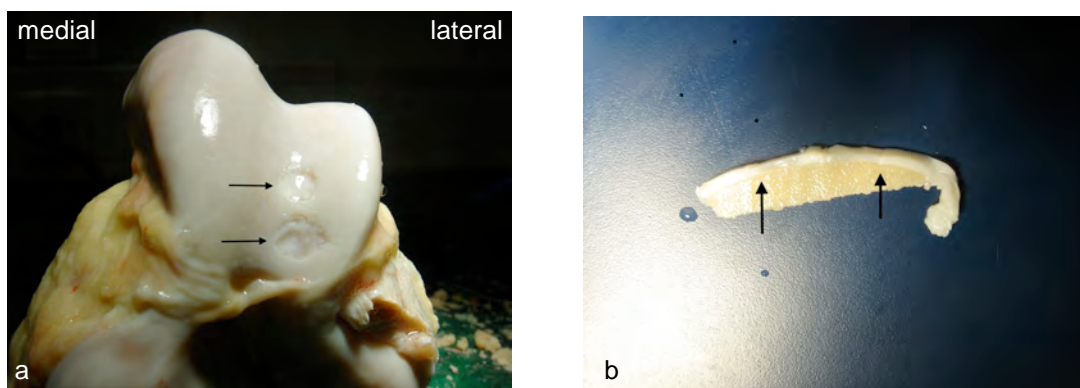
Der Füllungszustand der Defekte post mortem ist unabhängig von der Defektgröße. Während 4 der 6 Defekte einen Füllungsgrad von über 90 % (93,7 %-99,4 %) zeigten, wurde bei den anderen beiden eine zum Teil unregelmäßige Füllung von 62,9 % (Pferd Nr.10 rechts) bzw. 75,1 % (Pferd Nr. 6 rechts) gemessen. Auf den Längsschnitten ist zu sehen, dass das Regeneratgewebe die Höhe der benachbarten Knorpelschulter erreicht.



**Abb. 14: Makroskopischer Befund nach Implantation des DTK (Pferd 6 li)**

a) Aufsicht auf den 1,0 cm x 1,5 cm großen Defekt (→). Es zeigt sich ein vollständig mit Regeneratgewebe gefüllter Defekt.

b) Schnittbild von Abb. 14a. Die Höhe der angrenzenden Knorpelschulter wird erreicht (↑).



**Abb. 15: Makroskopischer Befund nach Implantation des DTK (Pferd 10 li)**

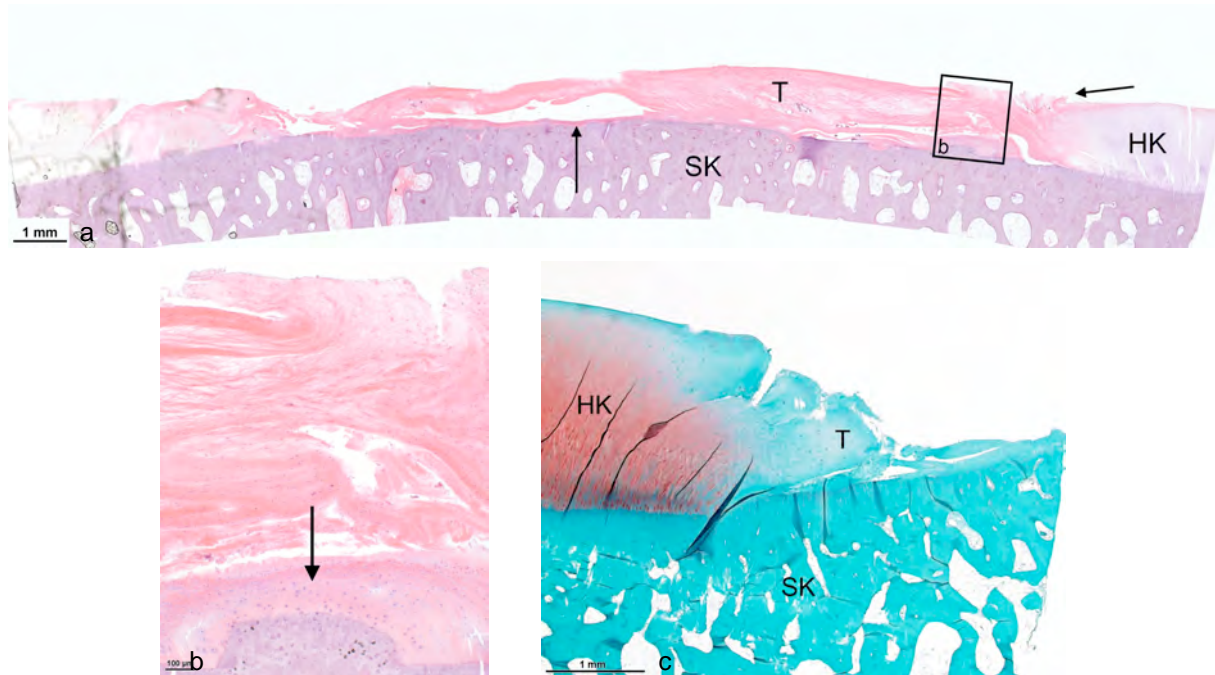
a) Aufsicht auf die zwei 1,0 cm durchmessenden Defekte (→), die beide komplett mit Regeneratgewebe gefüllt sind.

b) Schnittbild von Abb. 15a. Auch hier wird die Höhe der angrenzenden Knorpelschultern erreicht (↑).

### Mikroskopie und Immunhistochemie

#### *Defekte der Größe 1,5 cm x 1 cm:*

Bereits in der Übersichtsaufnahme der exemplarischen Darstellung (Abb. 16a) zeigt sich eine unvollständige Füllung des Defektareals. Die Oberfläche erscheint überwiegend glatt, im Übergangsbereich zum nativen Knorpel (Interface-Region) jedoch unruhig (Abb. 16a, horizontaler Pfeil). Zudem sind horizontale Rissbildungen im Regenerat zu erkennen. Im Randbereich wird die Höhe der angrenzenden Knorpelschulter erreicht, weiter zentral zeigt sich ein niedrigeres Niveau. Seitlich ist das Regenerat fest mit dem nativen Knorpel verwachsen. Basal wirkt das Regenerat nicht durchgängig mit dem darunterliegenden Knochen bzw. der Mineralisierungszone verankert (Abb. 16a, senkrechter Pfeil). Bei weiterer Vergrößerung fällt ein gelenknahes faserreiches Gewebe mit fibrozytenähnlichen Zellen auf. Basal zeigen sich vermehrt Knorpelzellen oder knorpelähnliche Zellen, die aus einem hyperostotischen Areal auszuwandern scheinen (16b, Pfeil). Diese liegen in einer faserarmen Matrix. Die Regenerate sind sowohl mit Safranin O (Abb. 16c) als auch mit Alcianblau nicht anfärbbar.

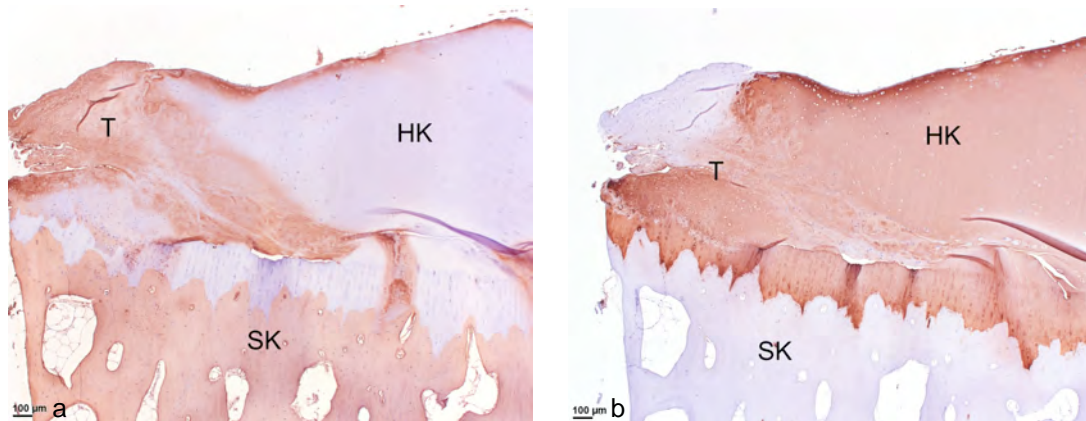


**Abb. 16:** Histologischer Befund nach Implantation des DTK (Pferde 6 li und 8 re)

- a) Histologische Übersichtsaufnahme von Pferd 6 links, HE-Färbung, 2,5fach vergrößert. Der Defekt ist nicht vollständig mit Regeneratgewebe gefüllt. Die Höhe der angrenzenden Knorpelschulter wird nahezu erreicht. Im Übergangsbereich von nativem hyalinen Knorpel (HK) zum Transplantat (T) erscheint die Oberfläche unruhig (←), jedoch ist eine stabile Verbindung beider Gewebe gegeben. Stellenweise ist das Transplantat vom subchondralen Knochen (SK) abgehoben (↑).
- b) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 16a, 10fach vergrößert. Die Knorpelzellen scheinen aus einem hyperostotischen Areal auszuwandern (↓). Das übrige Gewebe wirkt zerklüftet.
- c) Safranin O-gefärbtes Präparat von Pferd Nr. 8 rechts am Übergang von nativem hyalinem Knorpel (HK) zum Regenerat, 2,5fach vergrößert. Das Transplantat (T) und der subchondrale Knochen (SK) werden nicht orange angefärbt.



Die Immunhistochemie zeigt eine ausgeprägte Reaktion des Regeneratgewebes mit dem Kollagen I-Antikörper (Abb. 17a), während Kollagen II nicht nachweisbar ist (Abb. 17b).



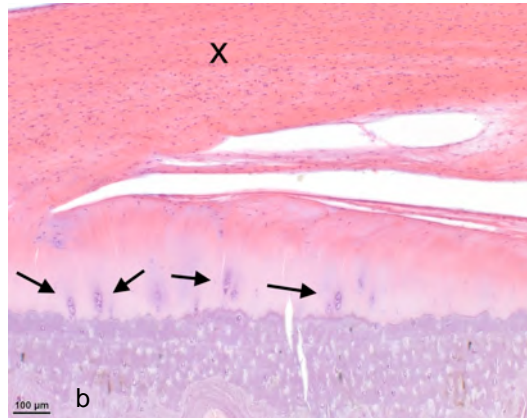
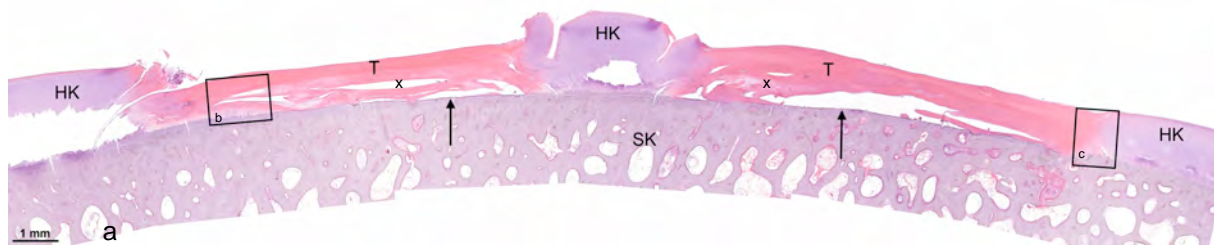
**Abb. 17: Immunhistochemischer Befund nach Implantation des DTK (Pferd 6 li)**

**a)** Reaktion des Gewebes mit dem Kollagen I-Antikörper (Pferd 6 links), 5fach vergrößert. Der hyaline Knorpel (HK) reagiert nicht mit dem Antikörper. Die bräunliche Färbung von Transplantat (T) und subchondralem Knochen (SK) sind Ausdruck der positiven Reaktion.

**b)** Reaktion des Gewebes mit dem Kollagen II-Antikörper (Pferd 6 links), 5fach vergrößert. Der hyaline Knorpel (HK) reagiert mit dem Kollagen II-Antikörper, während der subchondrale Knochen (SK) und das Transplantat (T) ungefärbt bleiben.

#### *Defekte der Größe 1cm x 1cm:*

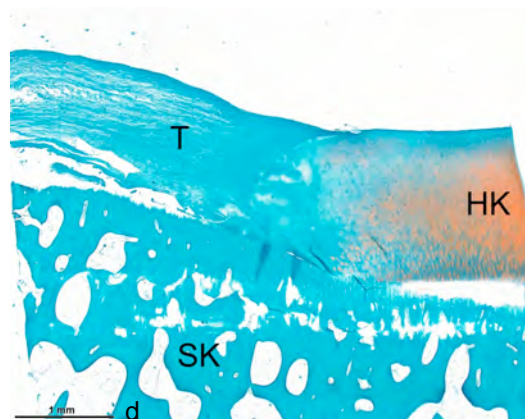
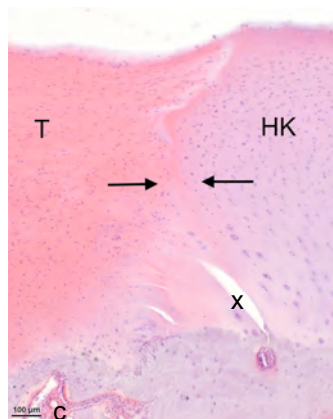
Die Regenerate bedecken auch die 1 cm durchmessenden Defekte unvollständig. Die Höhe des ortsständigen Knorpels wird am Rand erreicht, zur Mitte hin flacht das Gewebe aber ab. Die Oberfläche erscheint glatt. An den Seiten liegt eine feste Verbindung mit dem nativen Knorpel vor (Abb. 18c, Pfeile). Basal ist das Konstrukt nur stellenweise mit dem darunter liegenden Knochen verankert. Bei intakter Mineralisierungszone fehlt die Verbindung mit dem Knochen. Im Regenerat kommt es zu horizontalen Rissbildungen (Abb. 18a, x). Basal zeigen sich vermehrt Chondrone, die vertikal ausgerichtet sind. Zum Gelenk hin sind keine Chondrozyten sichtbar. Hier handelt es sich um faseriges Bindegewebe (Abb. 18b). Diesen Eindruck bestätigt die Reaktion mit Kollagen II (Abb. 19), bei der das Regeneratgewebe auf der knochen nahen Seite nur vereinzelt mit dem Antikörper reagiert, während sich der native Knorpel durch die Reaktion bräunlich darstellt. Das Gewebe im ursprünglichen Defekt lässt sich weder mit Safranin-O (Abb. 18d) noch mit Alcianblau anfärben.



**Abb. 18: Histologischer Befund nach Implantation des DTK (Pferde 10 li und 6 re)**

a) Histologische Übersichtsaufnahme von Pferd 10 links, HE-Färbung, 2,5fach vergrößert. Das Transplantat (T) erreicht die Höhe des ortsständigen Knorpels. Es weist horizontale Rissbildungen (x) auf und hebt sich stellenweise vom subchondralen Knochen (SK) ab (↑). Die Verbindung zum hyalinen Knorpel (HK) ist gegeben. Die Oberfläche erscheint glatt.

b) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 18a, 10fach vergrößert. Basal kann man vertikal ausgerichtete Chondrone erkennen (→). Weiter apikal zeigt sich faseriges Bindegewebe (x).



c) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 18a, 10fach vergrößert. Nativer hyaliner Knorpel (HK) und Transplantat (T) gehen größtenteils eine feste Verbindung ein (→←). Basal zeigt sich auf diesem Ausschnittsbild eine fehlende Anhaftung (x).

d) Safranin O-Färbung eines Präparates von Pferd Nr. 6 rechts am Übergang vom Regenerat (T) zum nativen hyalinen Knorpel (HK), der sich mit Safranin O orange anfärben lässt. 2,5fach vergrößert. Das Transplantat (T) und der subchondrale Knochen (SK) lassen sich nicht anfärben.



**Abb. 19: Immunhistochemischer Befund nach Implantation des DTK (Pferd 10 li)**

Reaktion des Gewebes mit dem Kollagen II-Antikörper (Pferd 10 links), 5fach vergrößert. Der ortsständige hyaline Knorpel (HK), die Mineralisierungszone (↑) und basale Abschnitte des Transplantats (T) reagieren mit dem Antikörper, während der größte Anteil des Transplantats und der subchondrale Knochen (SK) keine Reaktion zeigen.

### 4.5.2 Kollagen I/III-Membran (KI/III)

#### Makroskopie

Ein Präparat der KI/III-Gruppe zeigt makroskopisch eine komplette Defektfüllung (Abb. 20). Alle anderen imponieren durch eine geringere Bedeckung des Areals mit neu entstandenem Gewebe ( $\bar{\varnothing}$  63,7 % (52,8 %-72,1 %)), welches teilweise bis auf den subchondralen Knochen abflacht (Abb. 21b, Pfeil). Auffällig ist, dass besonders in den medialen Abschnitten der Defekte Regeneratgewebe entstanden ist. Die Höhe der angrenzenden Knorpelschulter wird nur selten erreicht, zeigt aber makroskopisch einen harmonischen Übergang zum nativen Knorpel.

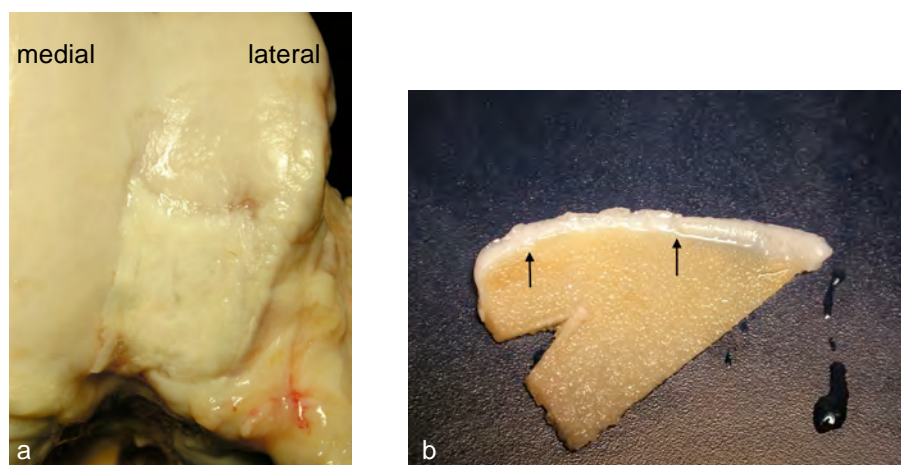


Abb. 20: Makroskopischer Befund nach MACI mit Kollagen I/III-Membran (Pferd 11 li)

a) Komplette Füllung des Defektareals.

b) Schnittbild von Abb. 20a. Die Höhe der angrenzenden Knorpelschulter wird hier erreicht (↑).

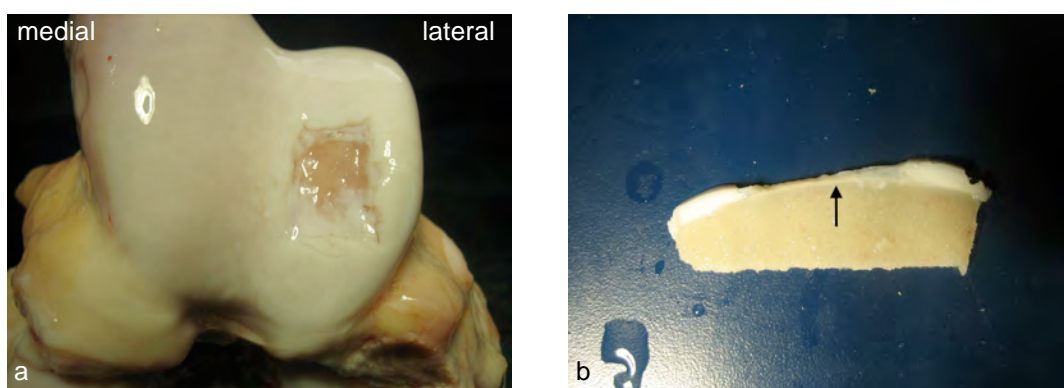


Abb. 21: Makroskopischer Befund nach MACI mit Kollagen I/III-Membran (Pferd 21 li)

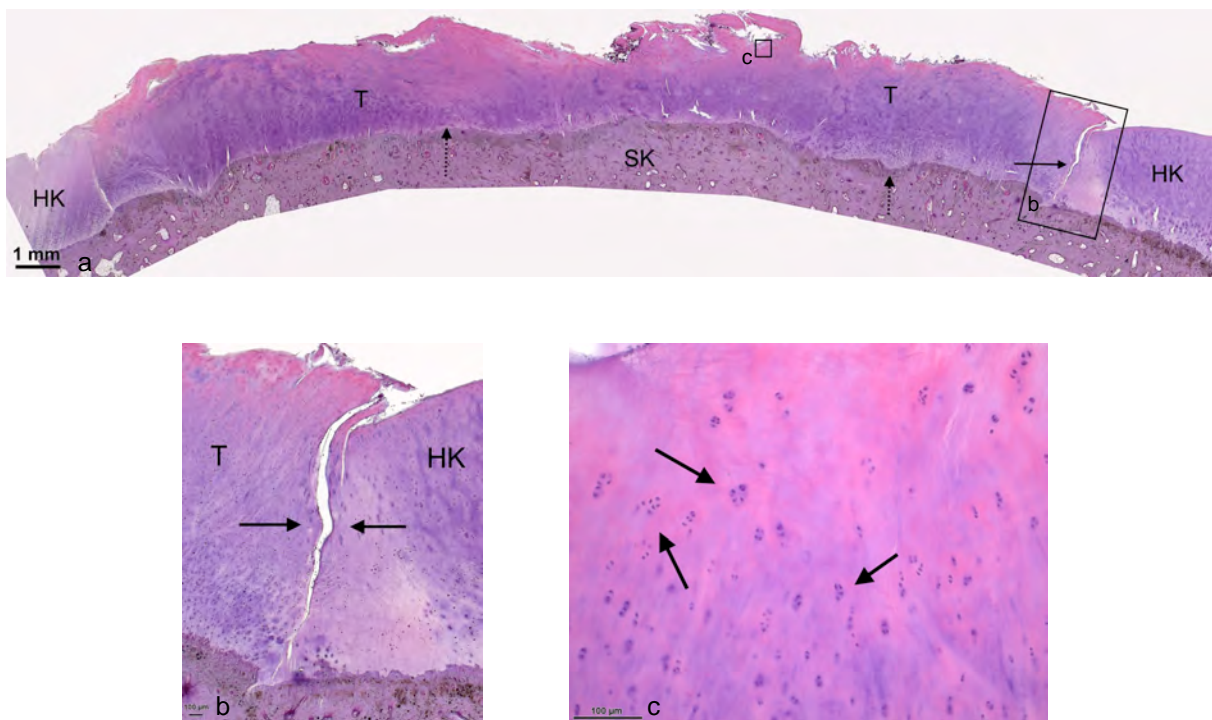
a) Aufsicht auf das Defektareal, das besonders in den medio-kaudalen Bereichen mit Regeneratgewebe gefüllt ist.

b) Schnittbild von Abb. 21a. Das Regeneratgewebe flacht zur Mitte hin bis auf den subchondralen Knochen ab (↑).



### Mikroskopie und Immunhistochemie

Das Regeneratgewebe des mit Kollagen I/III-Membran versorgten Defekts erreicht im Randbereich nahezu das Niveau des ortsständigen Knorpels, bei 3 von 6 Präparaten flacht es zur Mitte hin deutlich ab (Abb. 23a). Die Oberfläche wirkt faserig aufgetrieben und es finden sich vereinzelt horizontale Risse im Regenerat. Der native Knorpel geht im Gegensatz zum makroskopischen Bild fast keine Verbindung mit dem neuen Gewebe ein, was sich bei  $\frac{2}{3}$  der Präparate in einer schmalen Spaltbildung zeigt (Abb. 22b und 23c, Pfeile). Die Adhäsion an den subchondralen Knochen ist durchgängig gegeben. Dieser zeigt durch Umbauvorgänge im Sinne von Sklerosierungen einen wellenförmigen Verlauf (Abb. 22a, senkrechte, gestrichelte Pfeile). Im Regenerat zeigen sich sowohl basal als auch zum Gelenk hin viele in eine faserreiche Matrix eingebettete Chondrozyten, die zum Teil isogene Gruppen bilden (Abb. 22c, Pfeile). Die durch die Färbung mit Alcianblau nachweisbaren sauren Proteoglykane, wie sie im hyalinen Knorpel vorkommen, lassen sich zwar in allen Regeneraten nachweisen, imponieren aber durch eine schwächere Farbtintensität (Abb. 23).



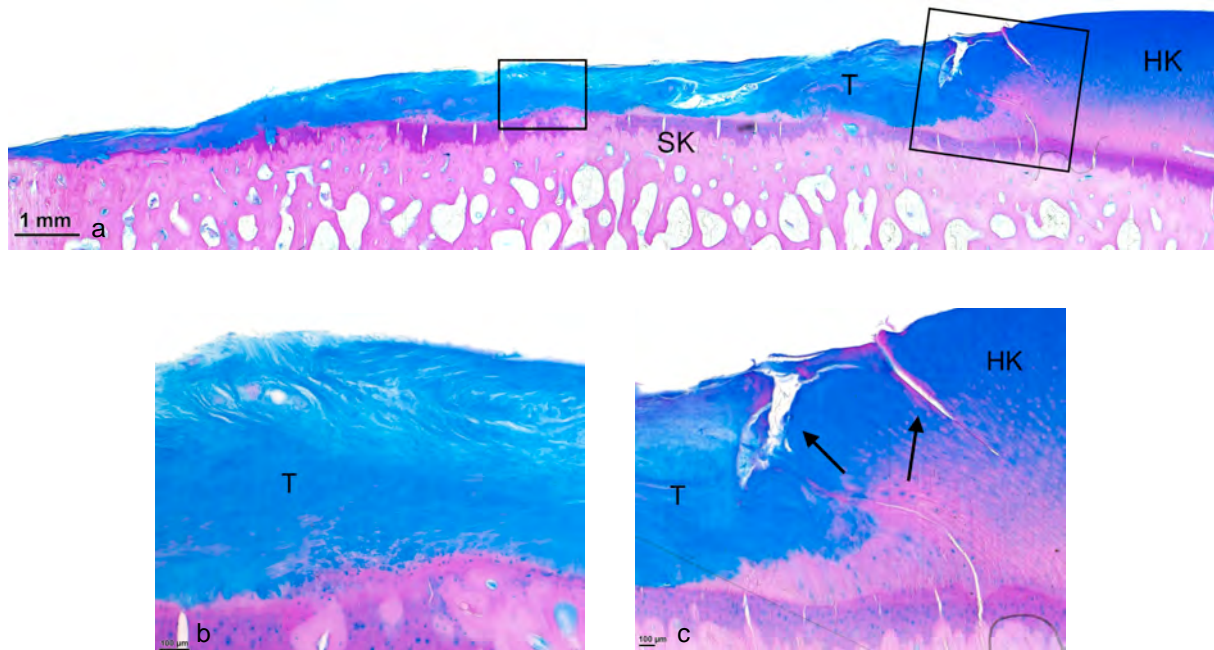
**Abb. 22:** Histologischer Befund nach MACI mit Kollagen I/III-Membran (Pferd 11 li)

a) Übersichtsaufnahme von Pferd Nr. 11 links mit HE-Färbung, 2,5fach vergrößert. Das Transplantat (T), das die Höhe der benachbarten Knorpelschulter erreicht, zeigt eine durchgängige Anhaftung am subchondralen Knochen (SK), der durch Umbauvorgänge wellenförmig verändert ist ( $\uparrow$ ). Die Verbindung zwischen ortsständigem Knorpel (HK) und Transplantat (T) ist durch eine vertikale Rissbildung unterbrochen ( $\rightarrow$ ). Die Oberfläche des neuen Gewebes wirkt zerklüftet.

b) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 22a, 5fach vergrößert. Rissbildung zwischen Transplantat (T) und hyalinem Knorpel (HK) ( $\rightarrow \leftarrow$ ).

c) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 22a, 20fach vergrößert. Hier zeigen sich multiple Chondrozyten, die in eine faserreiche Matrix eingebettet sind und zum Teil isogene Gruppen bilden (Pfeile).

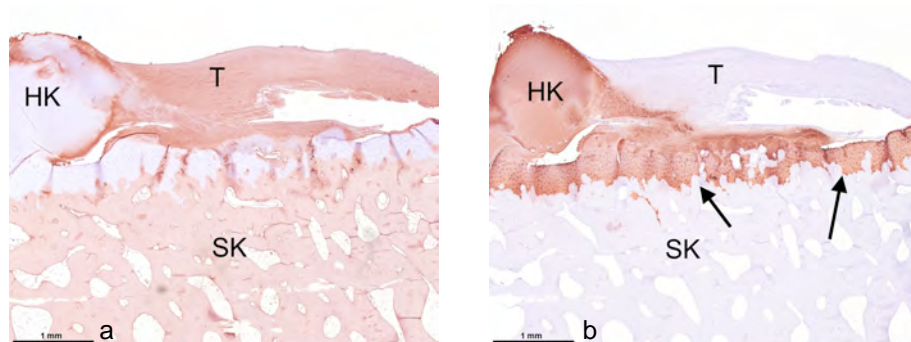




**Abb. 23:** Histologischer Befund nach MACI mit Kollagen I/III-Membran (Pferd 7 re)

- a) Übersichtsaufnahme von Pferd 7 rechts mit Alcianblau-Färbung, 2,5fach vergrößert. Im Randbereich erreicht das Transplantat (T) die Höhe des benachbarten hyalinen Knorpels (HK). Der subchondrale Knochen (SK) ist durchgängig mit dem Transplantat verbunden. Die Oberfläche erscheint eben.
- b) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 23a, 10fach vergrößert, oberflächlich zeigt sich eine schwächere Anfärbung des Regeneratgewebes (T) mit Alcianblau als basal.
- c) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 23a, 5fach vergrößert, Rissbildungen am Übergang von nativem hyalinem Knorpel (HK) und Transplantat (T) (↑).

Der Knochen und das zum Gelenk hin gelegene Regeneratgewebe zeigen durch die braune Färbung einen positiven Nachweis auf Kollagen I (Abb. 24a). Beim Nachweis von Kollagen II zeigt sich lediglich in den basalen Abschnitten des Regenerats und in der dem subchondralen Knochen aufliegenden Mineralisierungszone eine dem nativen Knorpel vergleichbare positive Reaktion (Abb. 24b). Die apikalen Abschnitte des Füllgewebes reagieren nicht mit dem Kollagen II-Antikörper.



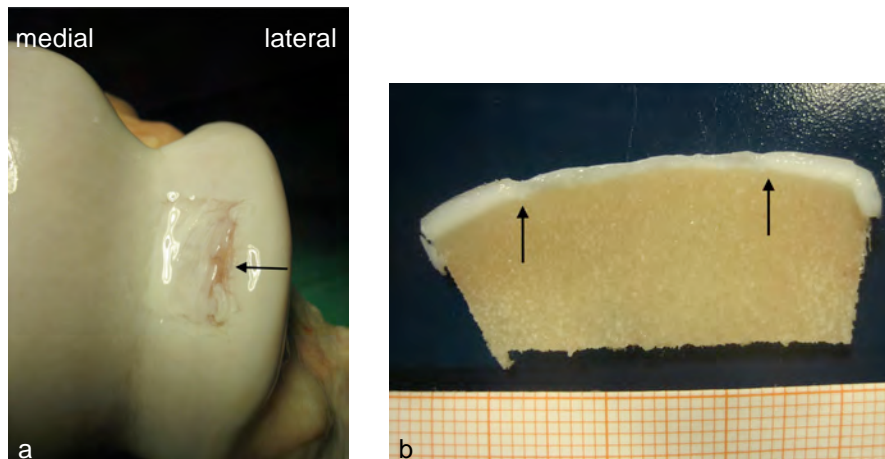
**Abb. 24:** Immunhistochemischer Befund nach MACI mit Kollagen I/III-Membran (Pferd 21 li)

- a) Reaktion des Gewebes mit dem Kollagen I-Antikörper (Pferd 21 links), 2,5fach vergrößertes Präparat. Transplantat (T) und subchondraler Knochen (SK) reagieren mit dem Kollagen I-Antikörper während der hyaline Knorpel (HK) nicht reagiert.
- b) Reaktion des Gewebes mit dem Kollagen II-Antikörper (Pferd 21 links), 2,5fach vergrößertes Präparat. Der ortsständige hyaline Knorpel (HK) sowie basale Abschnitte des Transplantats inklusive der Mineralisierungszone (↑) reagieren mit dem Kollagen II-Antikörper.

### 4.5.3 Hyaluronsäure-Vlies (H)

#### Makroskopie

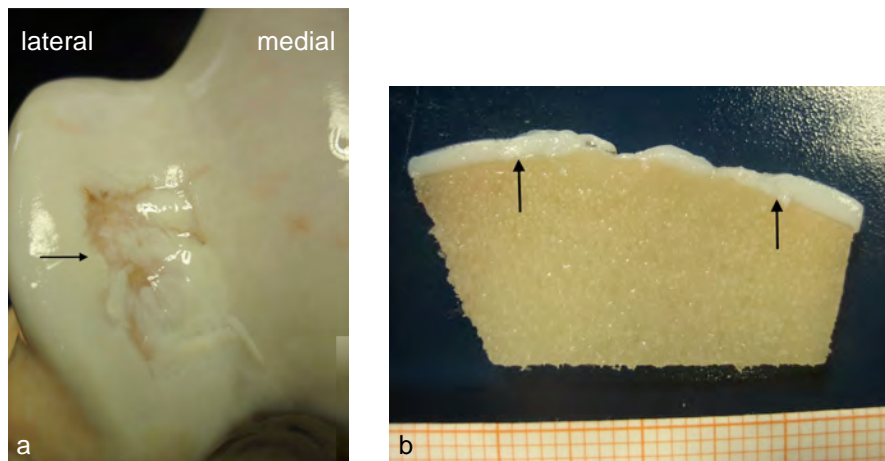
Die Defekte der Pferde aus der Gruppe der Hyaluronsäure-Vliese sind zum größten Teil fast vollständig mit Regeneratgewebe gefüllt ( $\bar{\varnothing}$  82,5 % (70,2 %-90,9 %)). Auf den Längsschnitten zeigt sich, dass die Dicke des Regenerats etwa  $\frac{2}{3}$  der Höhe des nativen ortsständigen Knorpels erreicht (Abb. 25b). Lateralseitig fällt häufig eine fehlende Anhaftung an die benachbarte Knorpelschulter auf (Abb. 25a und 26a, Pfeile).



**Abb. 25: Makroskopischer Befund nach MACI mit Hyaluronsäure-Vlies (Pferd 14 li)**

**a) Aufsicht auf das Defektareal. Lateralseitig ist der Defekt nicht komplett gefüllt (←).**

**b) Schnittbild von Abb. 25a. Das Regeneratgewebe erreicht hier nicht die Höhe der angrenzenden Knorpelschulter (↑).**



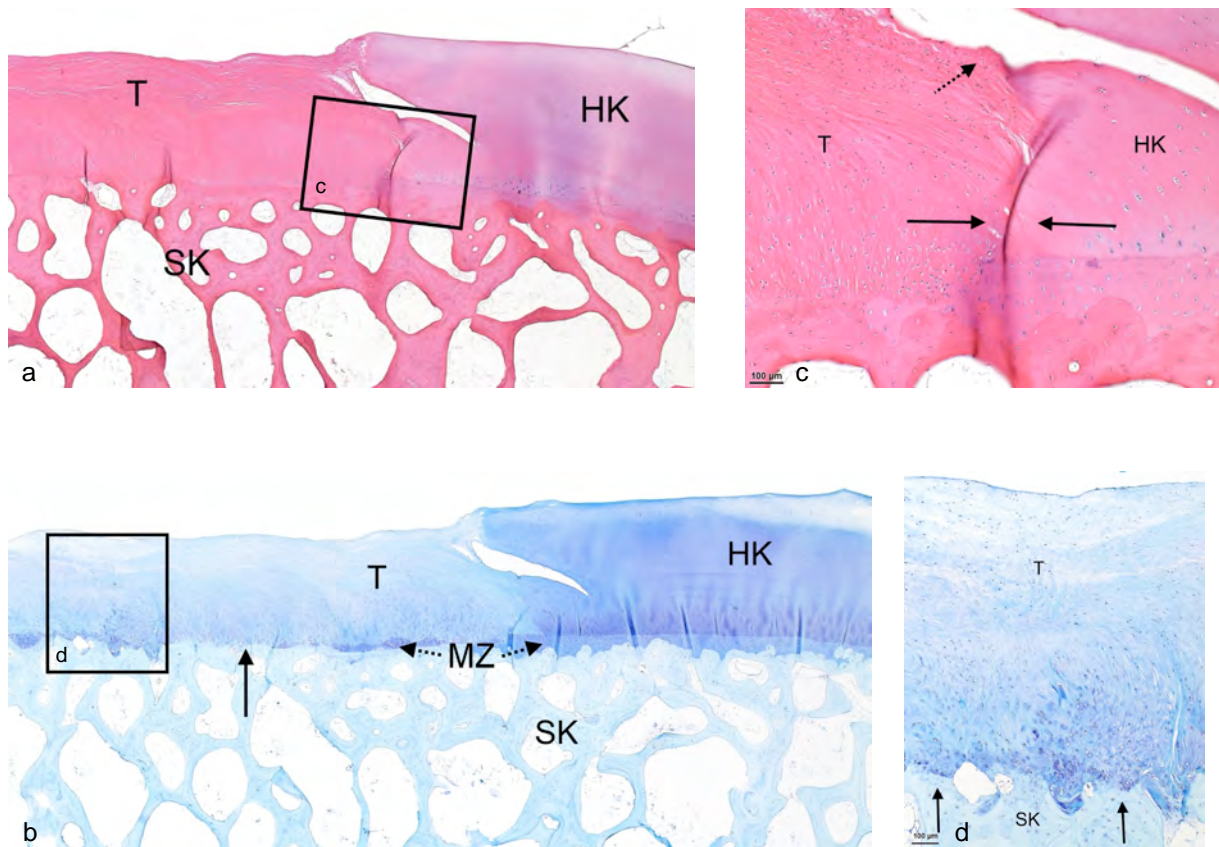
**Abb. 26: Makroskopischer Befund nach MACI mit Hyaluronsäure-Vlies (Pferd 14 re)**

**a) Aufsicht auf das Defektareal. Während die größten Teile des Defektareals gedeckt sind, zeigt sich lateral eine inkomplette Füllung (→).**

**b) Schnittbild von Abb. 26a. Das Transplantat erreicht fast die Höhe der angrenzenden Knorpelschulter (↑). Insgesamt imponiert dieses Schnittbild durch eine unregelmäßige Defektfüllung.**

### Mikroskopie und Immunhistochemie

Während die Regenerate der Hyaluronsäure-Gruppe im Randbereich häufig das Niveau der angrenzenden Knorpelschulter erreichen, verliert das Gewebe zur Mitte des Defekts an Höhe. Die Oberfläche stellt sich als homogen glatt und ohne Auffaserungen dar. Nativer Knorpel und Regenerat sind größtenteils lückenlos verbunden (Abb. 27c). Teilweise finden sich im Übergangsbereich vom Transplantat zum ortsständigen Knorpel horizontale Rissbildungen, die stellenweise auch weiter medial im Präparat auftreten (Abb. 28a). Das Hyaluronsäure-Vlies scheint über den gesamten Bereich fest mit dem subchondralen Knochen verankert (Abb. 27a). Fokal weist die ehemalige Mineralisierungszone einen Umbau zu Lamellenknochen auf (Abb. 27b, senkrechter Pfeil). In den basalen Abschnitten des Regeneratgewebes erscheinen Zellen mit Chondrozyten-ähnlicher Morphologie. Weiter apikal verändern die Zellen ihren Charakter und wirken durch ihren spindelförmigen Aufbau Fibrozyten-ähnlich (Abb. 28c). Das gesamte Regenerat wird durch ein Netzwerk kollagener Fasern durchzogen. Während die Fasern knochennah eher einem vertikalen Verlauf folgen, sind sie zum Gelenk hin größtenteils horizontal ausgerichtet (Abb. 28c). Auf Abb. 27c ist ein horizontaler Riss im nativen Knorpel zu erkennen, der als Ausdruck der Instabilität zwischen hyalinem Knorpel und Transplantat zu werten ist. Der basische Farbstoff Toluidinblau bindet an die saure Chondroitinschwefelsäure der Knorpelgrundsubstanz. Im Gegensatz zum stark angefärbten hyalinen Knorpel erscheint das Regenerat in einem schwächeren Blau (Abb. 27b).



**Abb. 27: Histologischer Befund nach MACI mit Hyaluronsäure-Vlies (Pferd 12 li)**

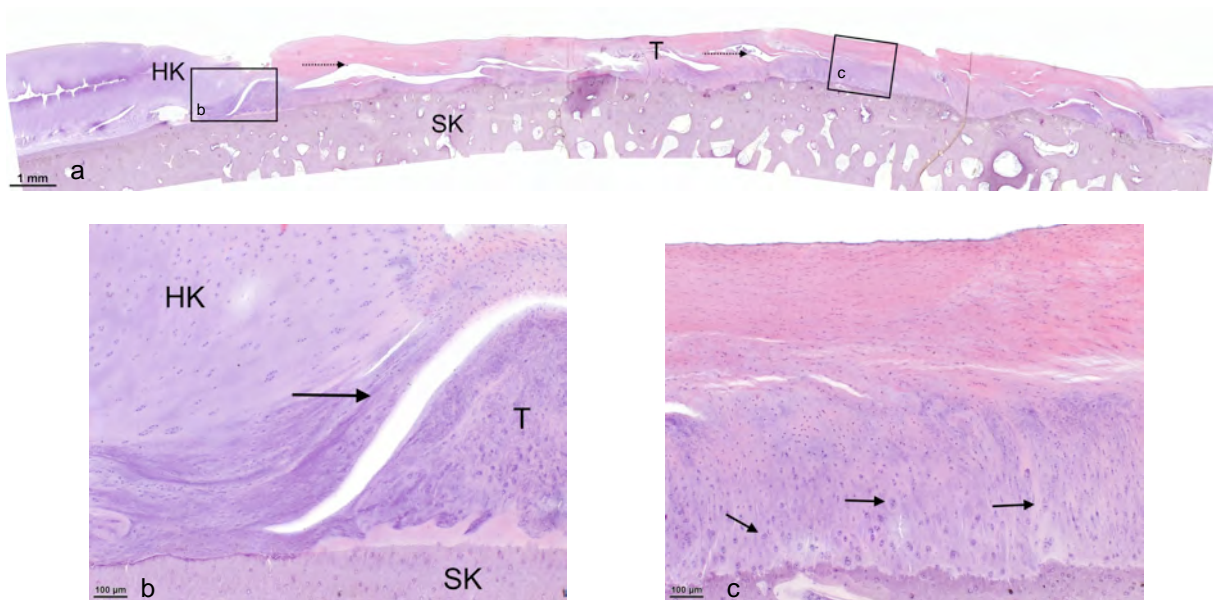
**a)** Übersichtsaufnahme von Pferd 12 links nach HE-Färbung, 2,5fach vergrößert. Im Randbereich wird die Höhe der angrenzenden Knorpelschulter (HK) erreicht.

**b)** Übersichtsaufnahme von Pferd 12 links nach Toluidinblau-Färbung, 2,5fach vergrößert. Der hyaline Knorpel (HK) weist eine stärkere Färbung mit Toluidinblau als das Transplantat (T) auf. Die Mineralisierungszone (<--MZ-->) ist stellenweise zu Lamellenknochen umgebaut, was sich in der fehlenden dunklen Blaufärbung zeigt (↑).

**c)** Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 27a, 10fach vergrößert. Der Bereich zwischen hyalinem Knorpel (HK) und Transplantat (T) zeigt basal eine gute Verankerung (→←). Weiter superfizial ist ein horizontaler Riss im nativen Knorpel zu erkennen (schräger -->). Dieser ist als Zeichen einer Instabilität zwischen HK und T aufzufassen.

**d)** Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 27b, 10fach vergrößert. In diesem Bereich zeigt sich eine gute Anheftung zwischen Transplantat (T) und subchondralem Knochen (SK) (↑). Das Toluidinblau bindet in basalen Bereichen des Regenerats gut an die saure Chondroitinschwefelsäure der Knorpelgrundsubstanz.

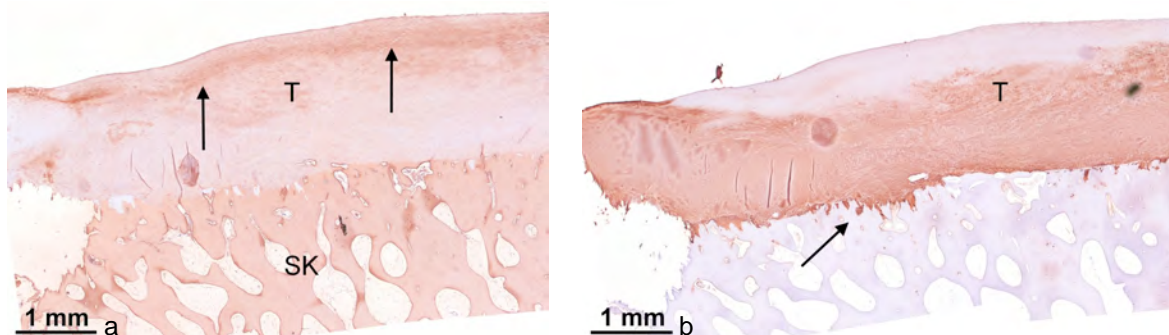




**Abb. 28:** Histologischer Befund nach MACI mit Hyaluronsäure-Vlies (Pferd 14 li)

- a) Übersichtsaufnahme von Pferd 14 links nach HE-Färbung, 2,5fach vergrößert. Über das gesamte Transplantat (T) treten horizontale Rissbildungen auf (-->). Auch im Übergangsbereich von hyalinem Knorpel (HK) zum Regenerat (T) ist die Verbindung unterbrochen (b). Die Oberfläche erscheint glatt.
- b) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 28a, 10fach vergrößert. Der ortsständige hyaline Knorpel (HK) geht hier keine durchgängige feste Verbindung mit dem Regeneratgewebe (T) ein (→). Die Verankerung mit dem subchondralen Knochen (SK) ist durchgehend vorhanden.
- c) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 28a, 10fach vergrößert. Knochennah sind die Fasern vertikal ausgerichtet, zum Gelenk hin zeigen sie einen horizontalen Verlauf. Basal weisen die Zellen einen Chondrozyt-Phänotyp (→) auf. Weiter superficial ähneln sie Fibrozyten.

Der Kollagen I-Antikörper reagiert sowohl mit dem subchondralen Knochen als auch mit dem oberen Drittel des Regeneratgewebes (Abb. 29a). Beim Nachweis von Kollagen Typ II färben sich die unteren zwei Drittel ebenso wie der ortsständige hyaline Knorpel durch die Reaktion mit dem Kollagen II-Antikörper braun. Die apikalen Abschnitte reagieren nicht mit dem Kollagen II-Antikörper (Abb. 29b).



**Abb. 29:** Immunhistochemischer Befund nach MACI mit Hyaluronsäure-Vlies (Pferd 13 re)

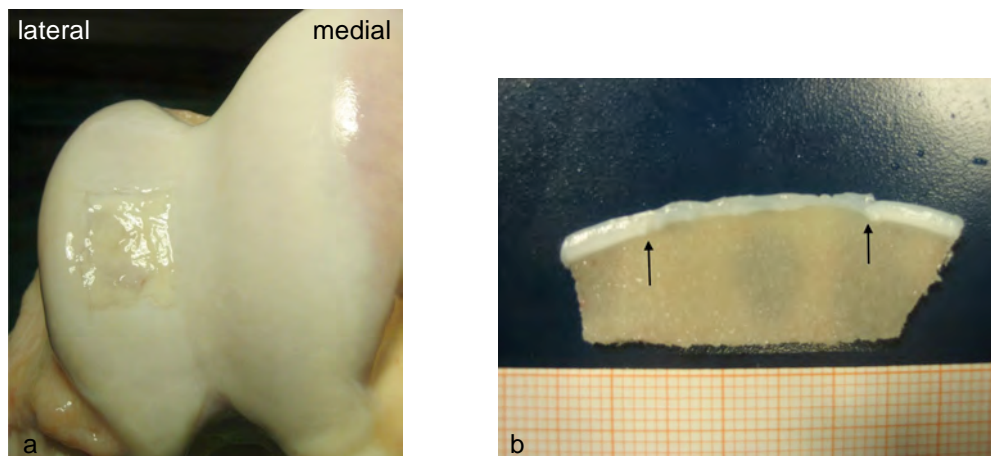
- a) Reaktion des Gewebes mit dem Kollagen I-Antikörper (Pferd 13 rechts), 2,5fach vergrößertes Präparat. Der subchondrale Knochen (SK) reagiert ebenso positiv mit dem Antikörper gegen Kollagen I wie das apikale Drittel des Regeneratgewebes (T, ↑).
- b) Reaktion des Gewebes mit dem Kollagen II-Antikörper (Pferd 13 rechts), 2,5fach vergrößertes Präparat. Bei  $\frac{2}{3}$  des Transplantats (T) zeigt sich eine positive Reaktion mit dem Antikörper gegen Kollagen II. Auch die Mineralisierungszone reagiert mit dem Antikörper (→).

#### 4.5.4 Kombination aus Hyaluronsäure-Vlies und Kollagen I/III-Membran

##### (H&KI/III)

##### Makroskopie

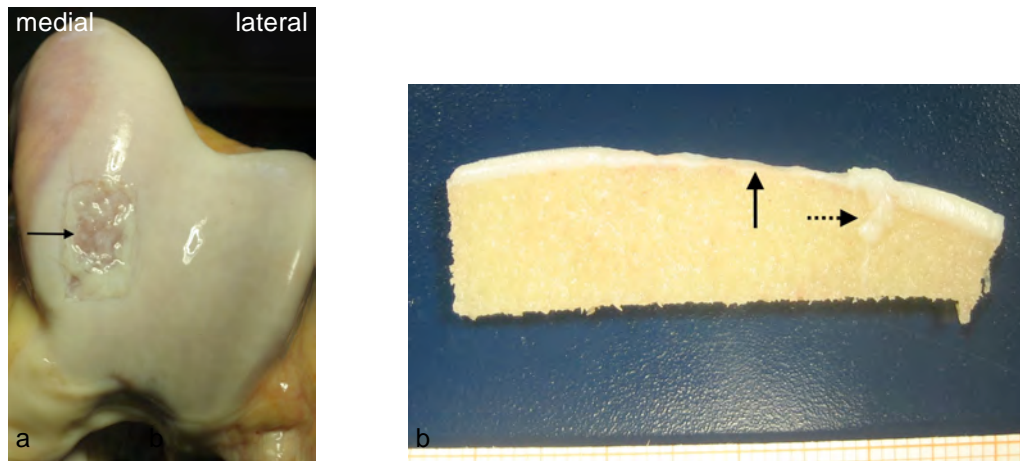
Aufgrund einer vorbestehenden Hautläsion musste bei den Pferden Nr. 15 und 16 linksseitig anstatt einer antero-lateralen eine antero-mediale Arthrotomie erfolgen. Die Transplantate dieser Kniegelenke wurden im jeweiligen medialen Patellagleitlager implantiert. Insgesamt zeigt sich eine Defektfüllung von durchschnittlich 82,5 % (70,2 %-90,9 %). Die Kniegelenke der Pferde Nr. 15 rechts (91,6%) und Nr. 17 rechts (99,6 %) imponieren durch eine fast vollständige Bedeckung des Defekts mit Regeneratgewebe (Abb. 30). Auf den Längsschnitten ist eine eher wellige Struktur des neu entstandenen Gewebes zu sehen (Abb. 30b und 31b). Die Höhe der angrenzenden Knorpelschulter wird in der Regel erreicht (Abb. 30b).



**Abb. 30: Makroskopischer Befund nach MACI mit H&KI/III (Pferd 17 re)**

**a) Aufsicht auf das Defektareal. Der Defekt ist vollständig mit Regeneratgewebe gefüllt. Er lässt sich dennoch vom umliegenden hyalinen Knorpel abgrenzen.**

**b) Schnittbild aus Abb. 30a. Die Höhe der angrenzenden Knorpelschulter wird beidseits erreicht (↑).**



**Abb. 31: Makroskopischer Befund nach MACI mit H&KI/III (Pferd 16 li)**

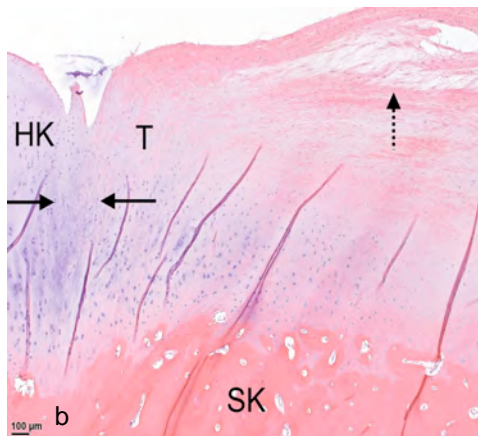
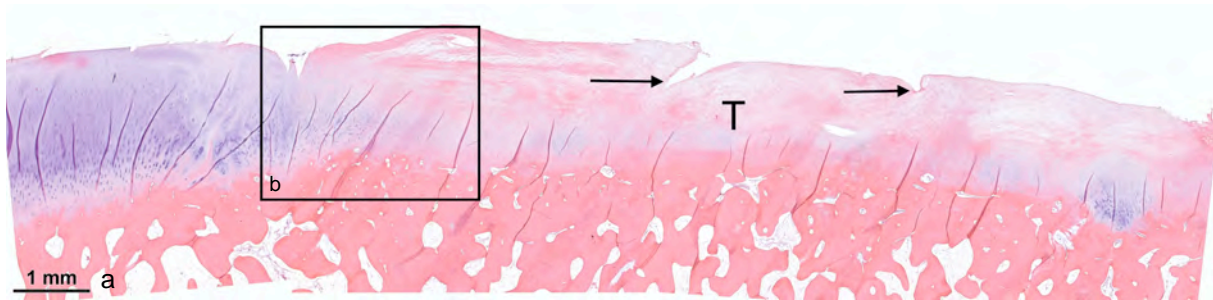
**a)** Aufsicht auf das Defektareal. Der medial angelegte Knorpeldefekt ist recht unregelmäßig mit Regeneratgewebe gefüllt. Besonders im Zentrum des Defekts ist subchondraler Knochen zu sehen (→).  
**b)** Auch im Schnittbild aus Abb. 31a ist eine unvollständige Defektfüllung zu beobachten (↑). Beim Bearbeiten dieses Präparates hat sich im Randbereich Regeneratgewebe vom subchondralen Knochen gelöst (→).

### Mikroskopie und Immunhistochemie

Die Areale der mit der Kombination aus Hyaluronsäure-Vlies (basal) und Kollagen I/III (superficial) versorgten Defekte sind fast vollständig mit Regeneratgewebe gefüllt. Eine Abgrenzung der jeweiligen eingebrachten Transplantate lässt sich zum Zeitpunkt der Euthanasie nicht mehr feststellen. Seitlich wird die Höhe der angrenzenden Knorpelschulter erreicht. Die Oberfläche des Regenerats ist durch einige wenige Einkerbungen unterbrochen (Abb. 32a, Pfeile), insgesamt erscheint sie jedoch relativ glatt. Das neu entstandene Gewebe imponiert durch eine gute Adhäsion sowohl mit dem subchondralen Knochen als auch mit dem ortsständigen hyalinen Knorpel (Abb. 32b, Pfeile). Im Füllgewebe zeigen sich horizontale Auffaserungen. Der subchondrale Knochen verläuft, bedingt durch Knochenan- und Abbauprozesse, wellenförmig.

Im basalen Drittel ähneln die runden Zellen, die oft als Paar nebeneinander liegen und von einem Hof umgeben sind, denen des hyalinen Knorpels. Zum Gelenk hin und zentralwärts nehmen diese Zellen jedoch ab und werden durch kleinere spindelförmige in horizontalen Fasern eingebettete Zellen, wie sie im Bindegewebe vorkommen, ersetzt (Abb. 32c, Pfeile). Passend zu diesen Beobachtungen ist das Ergebnis der Toluidinblau-Färbung: In den knochen nahen Abschnitten zeigt sich eine Blaufärbung, die in ihrer Intensität der des nativen hyalinen Knorpels ähnelt. Gelenknah hingegen ist das Gewebe nicht anfärbbar (Abb. 32d).

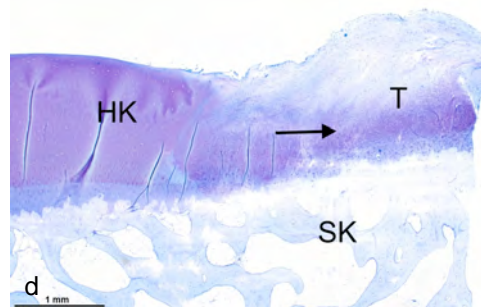
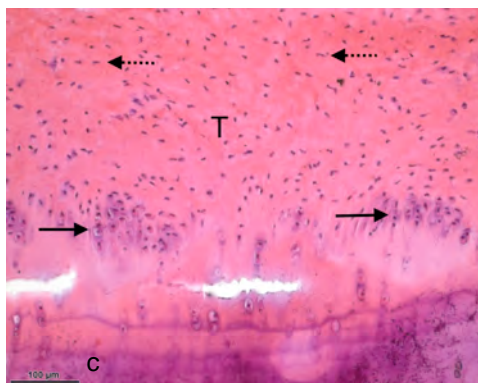




**Abb. 32: Histologischer Befund nach MACI mit H&KI/III (Pferde 17 re, 15 re und 15 li)**

**a) Übersichtsaufnahme von Pferd 17 rechts nach HE-Färbung, 2,5fach vergrößert. Das Präparat dieses Transplantats (T) zeigt eine homogene Defektfüllung. Bis auf wenige Einkerbungen (→) erscheint die Oberfläche relativ glatt.**

**b) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 32a, 5fach vergrößert. Das Transplantat (T) geht sowohl mit dem ortsständigen hyalinen Knorpel (HK) eine feste Verbindung ein (→ ←) als auch mit dem subchondralen Knochen (SK). Oberflächlich sind im Regeneratgewebe horizontale Auffaserungen zu sehen (gestrichelter Pfeil).**

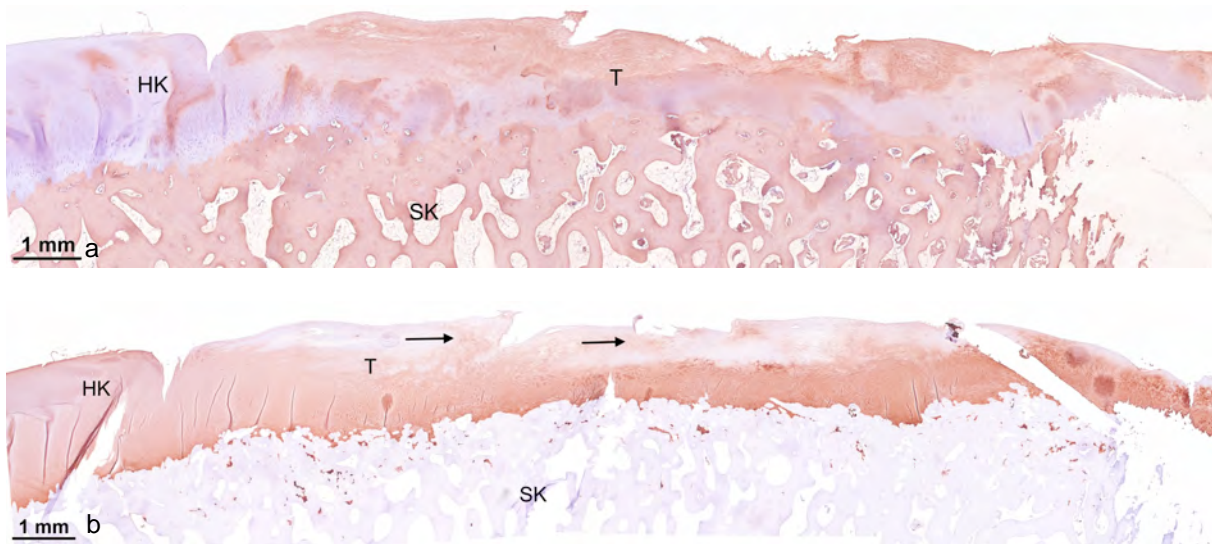


**c) HE-gefärbtes Präparat von Pferd Nr. 15 rechts, 20fach vergrößert. In den knochen nahen Bereichen des Transplantats (T) finden sich vertikal ausgerichtete Zellen, welche die Morphologie von Chondrozyten aufweisen (→) und von einem Hof umgeben sind. Zum Gelenk hin finden sich spindelförmige, an Fibrozyten erinnernde, Zellen (←--).**

**d) Toluidinblau gefärbtes Präparat von Pferd Nr. 15 links, 2,5fach vergrößert. In den basalen Abschnitten des neu entstandenen Gewebes (T) lässt sich eine Blaufärbung erkennen (→), die in ihrer Intensität der des hyalinen Knorpels (HK) gleicht. Weiter oberflächlich zeigt sich ebenso wie im subchondralen Knochen (SK) keine Blaufärbung.**



Die Immunhistochemie zeigt einen Nachweis von Kollagen I im Knochen und in den gelenknahen Anteilen des Regeneratgewebes (Abb. 33a). Der Kollagen II-Antikörper reagiert mit dem angrenzenden hyalinen Knorpel und den basalen  $\frac{2}{3}$  des Füllgewebes (Abb. 33b). Auch vereinzelte apikale Abschnitte zeigen durch ihre Braunfärbung einen positiven Nachweis von Kollagen II (Abb. 33b, Pfeil).



**Abb. 33: Immunhistochemischer Befund nach MACI mit H&KI/III (Pferd 17 re)**

a) Reaktion des Gewebes mit dem Kollagen I-Antikörper (Pferd 17 rechts), 2,5fach vergrößertes Präparat. Sowohl der subchondrale Knochen (SK) als auch die gelenknahen Areale des Transplantats (T) reagieren mit dem Kollagen I-Antikörper. Eine Reaktion des ansässigen hyalinen Knorpels (HK) bleibt aus.

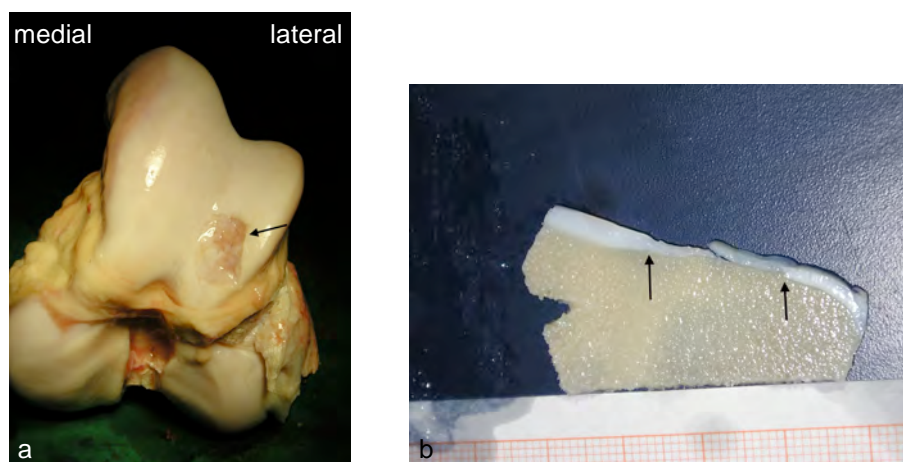
b) Reaktion des Gewebes mit dem Kollagen II-Antikörper (Pferd 17 rechts), 2,5fach vergrößertes Präparat. Der native hyaline Knorpel (HK) reagiert regelrecht mit dem Kollagen II-Antikörper. Auch die knochennahen Anteile des Regeneratgewebes (T) zeigen durchgängig eine positive Reaktion mit dem Antikörper gegen Kollagen II, was sich in der homogenen Braunfärbung erkennen lässt. Darüber hinaus findet sich in apikaleren Bereichen vereinzelt Gewebe, das ebenfalls mit Kollagen II reagiert (→).

### 4.5.5 Kollagen I-Gel (KI)

#### Makroskopie

Die mit dem Kollagen I-Gel versorgten Kniegelenke zeigen eine Defektfüllung von durchschnittlich 66 % (42,1 %-90,5 %). Besonders in den medio-kaudalen Abschnitten findet sich ein homogenes Gewebe. In kranio-lateralen Bereichen scheint dies herausgelöst zu sein (Abb. 34a, Pfeil).

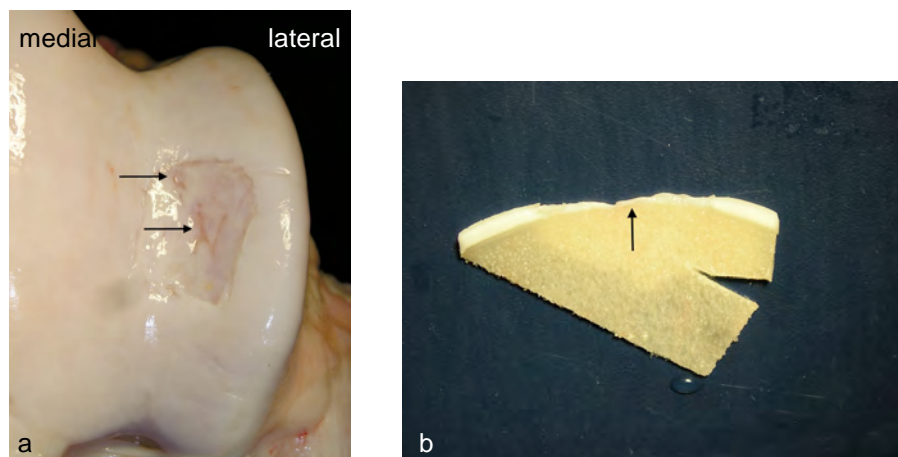
Den Schnittbildern kann man entnehmen, dass die Höhe der benachbarten Knorpelschultern nur im Randbereich erreicht wird und das Füllgewebe zur Mitte des Defekts abflacht (Abb. 34b und 35b).



**Abb. 34: Makroskopischer Befund nach MACI mit Kollagen I-Gel (Pferd 18 li)**

a) Aufsicht auf das Defektareal. Medio-kaudal zeigt sich eine gute Defektfüllung. Weiter kranial und lateral lässt sich subchondraler Knochen erkennen (←).

b) Schnittbild aus Abb. 34a. Die Höhe der benachbarten Knorpelschulter wird nur im Randbereich erreicht (↑).



**Abb. 35: Makroskopischer Befund nach MACI mit Kollagen I-Gel (Pferd 19 li)**

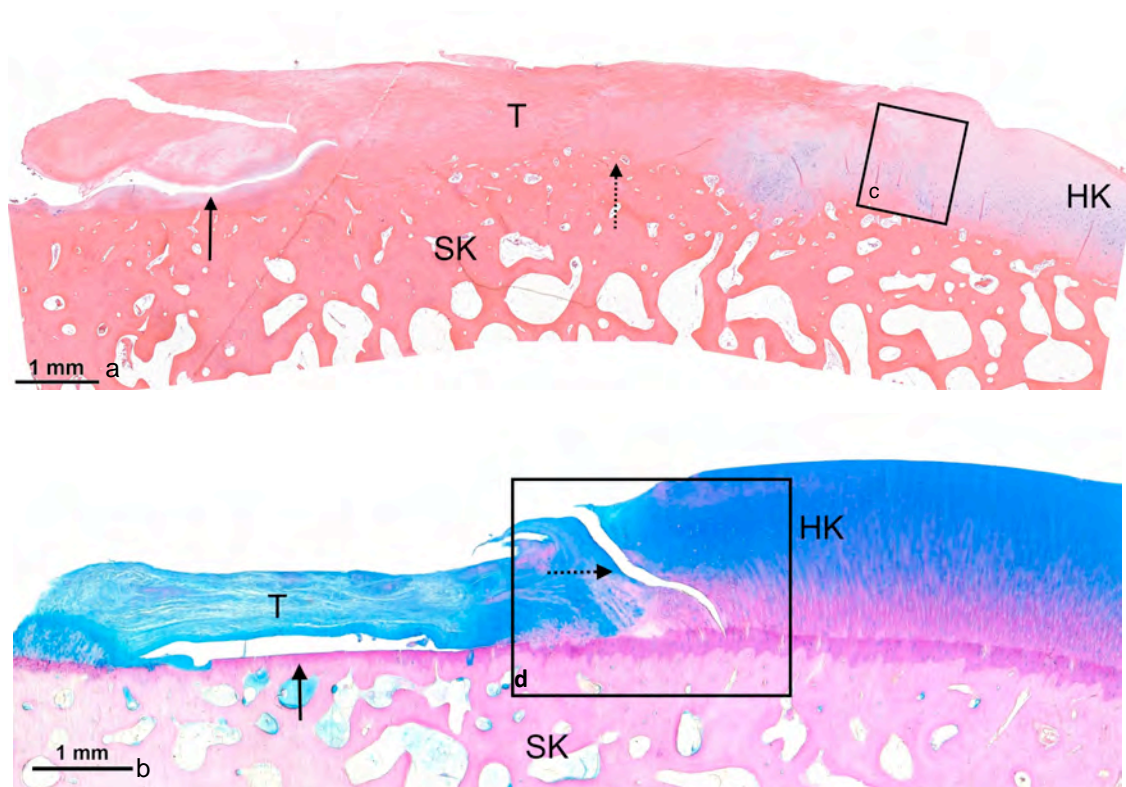
a) Aufsicht auf das Defektareal. Das Defektareal ist fast vollständig mit Gewebe gefüllt. In wenigen Bereichen scheint subchondraler Knochen durch (→).

b) Schnittbild aus Abb. 35a. Die Oberfläche zeigt einen welligen Verlauf. Das Füllgewebe dieses Präparats verliert zur Mitte an Höhe (↑).

### Mikroskopie und Immunhistochemie

Die Höhe der angrenzenden Knorpelschulter wird im Randbereich nahezu immer erreicht. Innerhalb der Regenerate sind Auffaserungen erkennbar (Abb. 36b), die Oberflächen scheinen jedoch glatt begrenzt. Das Füllgewebe zeigt überwiegend eine gute Anheftung an den subchondralen Knochen. Teilweise wirkt das Präparat jedoch vom Knochen abgehoben (Abb. 36a- b). Die Verbindung zum benachbarten hyalinen Knorpel ist stellenweise durch eine Rissbildung unterbrochen (Abb. 36b, d, gestrichelte Pfeile). Der Knochen unter dem neu entstandenen Gewebe nimmt durch Knochenumbauvorgänge einen welligen Verlauf an (Abb. 36a).

Ein Netzwerk aus Fasern, in das besonders Fibrozyten-ähnliche Zellen eingelagert sind, durchzieht das Regeneratgewebe. An der Grenze zum ortsständigen Knorpel finden sich Zellen, die Chondrozyten gleichen (Abb. 36c) und deren Matrix sich bei Färbung mit Alcianblau darstellen lässt (Abb. 36b, d).

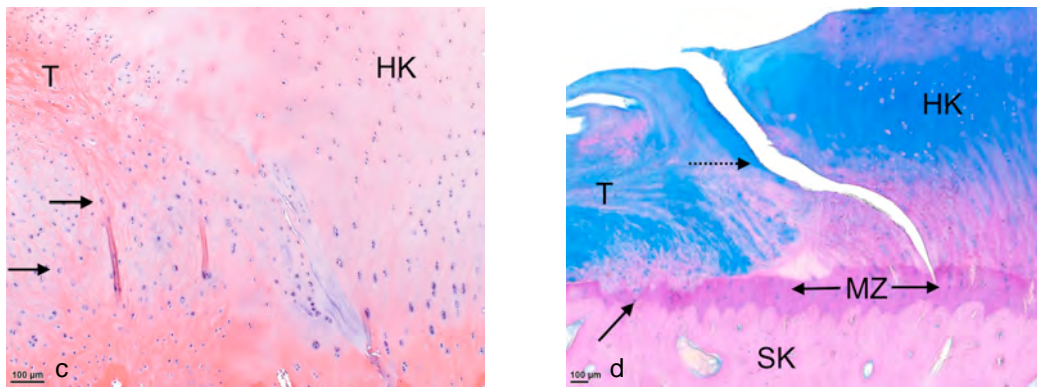


**Abb. 36:** Histologischer Befund nach MACI mit Kollagen I-Gel (Pferde 20 re und 19 li)

a) Übersichtsaufnahme von Pferd 20 rechts nach HE-Färbung, 2,5fach vergrößert. Das Transplantat (T) erreicht die Höhe der angrenzenden Knorpelschulter und ist fest mit dem benachbarten hyalinen Knorpel (HK) verankert. Die Oberfläche wirkt eben. Teilweise scheint sich das Regeneratgewebe vom subchondralen Knochen (SK) zu lösen (↑). Der Knochen unterhalb des Knorpels (SK) nimmt einen welligen Verlauf an (gestrichelter ↑).

b) Übersichtsaufnahme von Pferd 19 links nach Alcianblau-Färbung, 2,5fach vergrößert. Transplantat (T) und hyaliner Knorpel (HK) sind durch einen vertikal verlaufenden Riss voneinander getrennt (-->). Stellenweise ist das Regenerat (T) vom subchondralen Knochen abgehoben (↑). Das Füllgewebe (T) färbt sich mit Alcianblau an, erreicht jedoch nicht die Farbintensität des nativen hyalinen Knorpels (HK).





c) Ausschnitt aus Abb. 36a, 10fach vergrößert. An der Grenze zum hyalinen Knorpel (HK) finden sich knochenähnliche Zellen im Transplantat (T), welche Chondrozyten gleichen (→).

d) Ausschnitt aus Abb. 36b, 5fach vergrößert. Deutliche Rissbildung zwischen Transplantat (T) und ortsständigem Knorpel (HK) (-->). Das Transplantat lässt sich mit Alcianblau gut anfärben. Die sich unter dem Knorpel befindliche Mineralisierungszone (←MZ→) ist lokal unter dem Regeneratgewebe (T) etwas ausgedünnt (↑), jedoch nicht vollständig unterbrochen.

In der Immunhistochemie zeigt sich in den gelenknahen Arealen des Regeneratgewebes eine positive Reaktion mit dem Kollagen I-Antikörper (Abb. 37a). Die basalen Abschnitte reagieren analog dem ortsständigen hyalinen Knorpel mit dem Kollagen II-Antikörper, was sich in der Braunfärbung des Präparates zeigt (Abb. 37b).

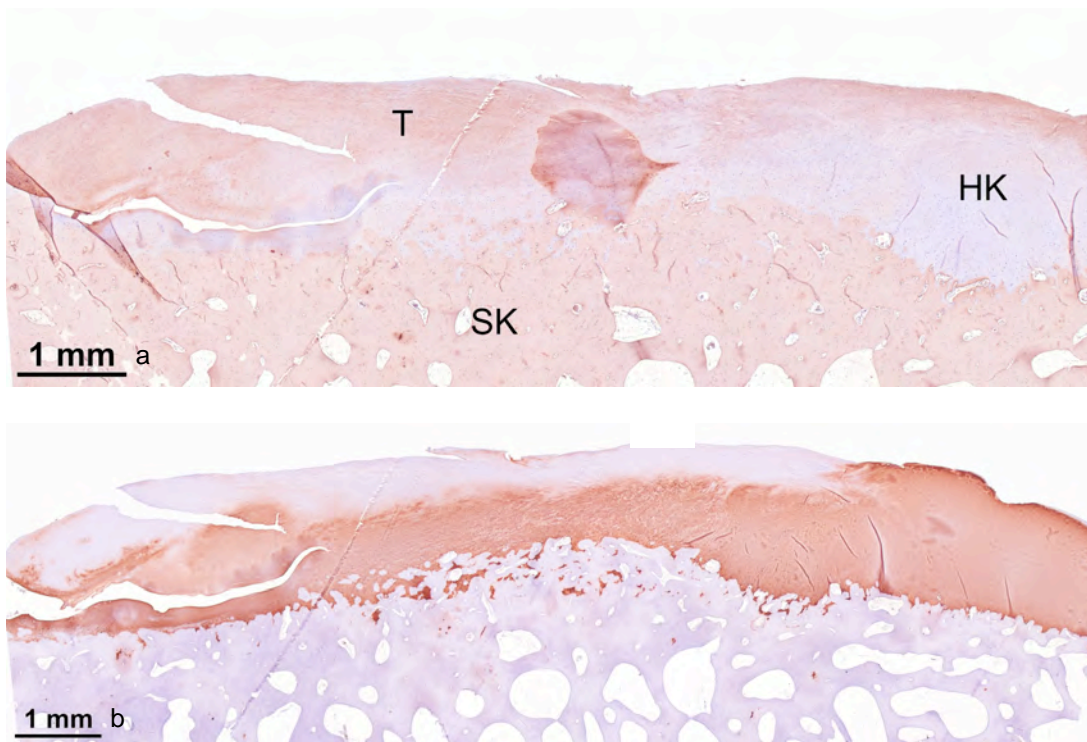


Abb. 37: Immunhistochemischer Befund nach MACI mit Kollagen I-Gel (Pferd 20 re)

a) Reaktion des Gewebes mit dem Kollagen I-Antikörper (Pferd 20 rechts), 2,5fach vergrößert. Der größte Teil des Transplantats (T), insbesondere aber das gelenknahe Areal, reagiert wie auch der subchondrale Knochen (SK) mit dem Antikörper gegen Kollagen I.

b) Reaktion des Gewebes mit dem Kollagen I-Antikörper (Pferd Nr. 20 rechts), 2,5fach vergrößert. Auf diesem Präparat ist eine deutliche Zweischichtigkeit des Transplantats (T) zu erkennen. Die dem subchondralen Knochen (SK) zugewandte Seite reagiert ebenso wie der ortsständige hyaline Knorpel (HK) mit dem Kollagen II-Antikörper.

## 4.6 ICRS-Score

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) im Chi-Quadrat-Test zwischen den jeweiligen Gruppen bei makroskopischer Bewertung nach dem ICRS-Score (Tabelle 9).

**Tabelle 8: Bewertung der makroskopischen Ergebnisse durch den ICRS-Score**

Implantat	Pferdenummer	Seite Kniegelenke	Grad der Defektdeckung	Integration in die Knorpelschulter	Makroskopisches Erscheinungsbild	ICRS-Score	ICRS-Grad
DTK	6	Re	3	3	3	9	II
	6	Li	3	4	3	10	II
	8	Re	3	4	3	10	II
	8	Li	2	4	3	9	II
	10	Re	2	2	2	6	III
	10	Li	2	4	3	9	II
Kollagen I/III	7	Re	2	2	1	5	III
	9	Re	1	2	2	5	III
	11	Re	1	2	2	5	III
	11	Li	4	4	4	12	I
	21	Re	3	2	1	6	III
	21	Li	2	1	1	4	III
Hyaluronsäure	12	Re	3	2	2	7	III
	12	Li	3	4	3	10	II
	13	Re	4	3	3	10	II
	13	Li	2	3	3	8	II
	14	Re	3	2	2	7	III
	14	Li	3	3	3	9	II
Kollagen I/III & Hyaluronsäure	15	Re	4	4	3	11	II
	15	Li	3	3	3	9	II
	16	Li	1	2	1	4	III
	17	Re	4	4	4	12	I
	17	Li	3	3	3	9	II
Kollagen I	18	Re	3	3	3	9	II
	18	Li	2	2	2	6	III
	19	Re	2	2	1	5	III
	19	Li	3	3	3	9	II
	20	Re	3	2	2	7	III
	20	Li	3	2	2	7	III

## 4.7 O`Driscoll-Score

Das Füllgewebe wurde anhand des O`Driscoll-Scores bewertet (Tabelle 9). Die erreichten Durchschnittswerte lagen zwischen 13,0 und 14,7 bei einem maximal zu erreichenden Wert von 24 (Tabelle 10). Die DTK-Gruppe erzielte einen durchschnittlichen Wert von 13,2 (12-14) Punkten. Dem gegenüber stehen die mit Trägermaterial versorgten Defekte, die auf einen Mittelwert von 14 (11-18) Punkten kommen.

**Tabelle 9: Bewertung der Regeneratgewebe nach dem O`Driscoll-Score**

Implantat	Max.	DTK	DTK	DTK	DTK	DTK	DTK	K I/III	K I/III	K I/III	K I/III	K I/III	K I/III	H	H	H	H	H	H	H & KI/III	H & KI/III	H & KI/III	H & KI/III	H & KI/III	KI	KI	KI	KI	KI	KI
Pferd Nr. & Seite Kniegelenk		6r	6l	8r	8l	10r	10l	7r	9r	11r	11l	21r	21l	12r	12l	13r	13l	14r	14l	15r	15l	16l	17r	17l	18r	18l	19r	19l	20r	20l
Zellmorphologie	4	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1
Safranin-O-Anfärbbarkeit	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1
<b>Gewebsstruktur</b>																														
- Oberflächenbeschaffenheit	3	2	3	2	3	2	2	3	0	3	2	2	1	0	3	3	3	1	2	2	1	1	2	3	2	2	2	2	3	2
- Strukturintegrität	2	1	1	0	0	0	1	1	0	2	1	1	0	1	1	0	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1
- Knorpeldicke	2	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	2	1	2	0	0	1	2	2	1	1	0	1	2	1	1	1	0
- Verbindung zum benachbarten nativen Knorpel	2	1	1	1	2	1	1	0	0	0	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Freiheit von zellulären degenerativen Veränderungen</b>																														
- Zelldichte	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
- Clusterbildung der Chondrozyten	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
- Veränderungen des benachbarten nativen Knorpels	3	2	2	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	3	2	2	2	3	3	2	3	3	2	2	2	2
<b>Summe, Punktwert</b>	<b>24</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>13</b>

Tabelle 10: Erreichte Durchschnittswerte anhand des O`Driscoll-Scores

Implantat	Gesamtwert	Durchschnittswert	Wertspanne
DTK	79	13,2	12-14
Kollagen I/III	78	13,0	11-15
Hyaluronsäure	83	13,8	13-15
Kollagen I/III & Hyaluronsäure	73	14,6	14-16
Kollagen I	88	14,7	13-18

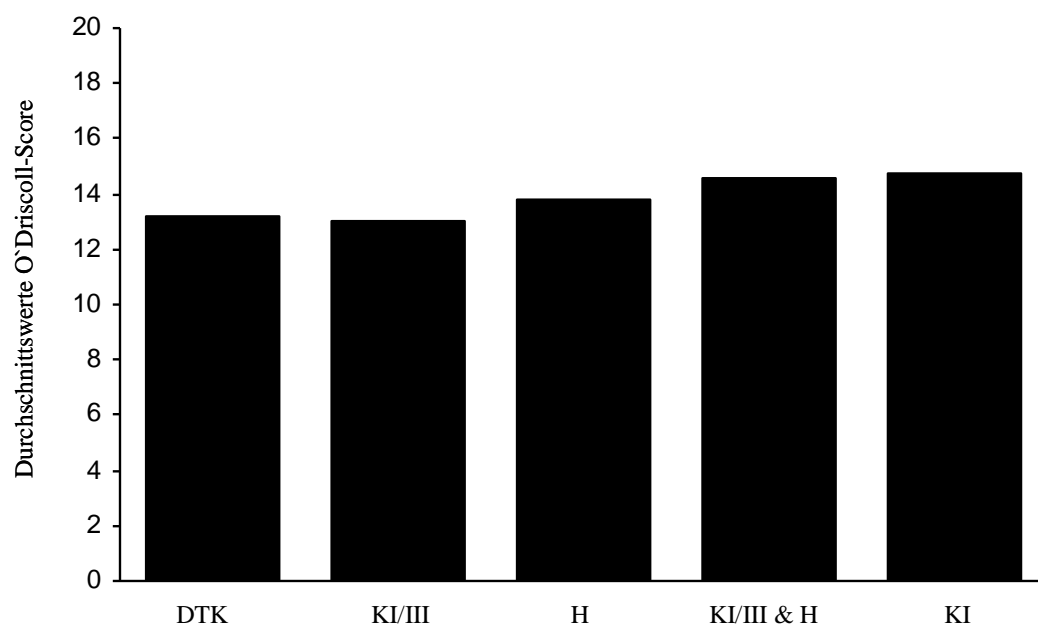


Diagramm 2: Grafische Darstellung der O`Driscoll-Score-Durchschnittswerte

## 5 Diskussion

Knorpelschäden in Gelenken als Folge von Verletzungen oder Degeneration stellen in Bezug auf die Wiederherstellung und die Heilung sowohl klinisch als auch wissenschaftlich ein nahezu ungelöstes Problem dar [63].

Eine besondere Herausforderung der Medizin ist die Entwicklung eines mechanisch belastbaren Knorpelregenerats, das dem originären hyalinen Knorpel gleicht.

In dieser tierexperimentellen Studie wurden die Langzeitergebnisse nach 18 Monaten von drei sich bereits in der klinischen Anwendung befindlichen Trägermaterialien der matrixassoziierten Chondrozytenimplantation mit einem druckkultivierten autologen dreidimensionalen trägerfreien Konstrukt (DTK), bestehend aus Knorpelzellen, in einem Großtiermodell am Pferd verglichen. Als Trägermaterialien kamen eine Kollagen I/III-Membran, ein Kollagen I-Gel und ein Hyaluronsäure-Vlies zum Einsatz. Des Weiteren wurde die Kombination aus Hyaluronsäure-Vlies basal und Kollagen I/III-Membran superfizial untersucht.

Für die einzelnen Verfahrenstechniken der matrixgekoppelten autologen Chondrozytenimplantation (MACI) liegen zwar jeweils tierexperimentelle Erkenntnisse vor, jedoch sind vergleichende industrie-unabhängige Tierstudien zur wissenschaftlichen Überprüfung der Operationsmethode nicht publiziert.

Der Vergleich der verschiedenen Verfahren erfolgte unter den Gesichtspunkten des klinischen Erscheinungsbildes, des Gangbildes, radiologischer Verlaufskontrollen und der grafischen Auswertung der Defektfüllungen sowie der makroskopischen, histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung der Regeneratgewebe. Zusätzlich wurde das neu entstandene Knorpelgewebe anhand des ICRS- und O'Driscoll-Scores beurteilt.

### 5.1 Operative Behandlung des Knorpelschadens

Arthroskopische Therapiemaßnahmen bei Knorpelschäden können kurz- bis mittelfristig zur Besserung des Beschwerdebildes des Patienten führen.

Zu den Maßnahmen des so genannten Gelenkdébridements zählen neben der Meniskusresektion, der Entfernung freier Gelenkkörper und der Abtragung von Osteophyten auch die Gelenk-Lavage und die Knorpelglättung.

In einer prospektiv angelegten Studie von Moseley et al. (2002) zeigte sich kein langfristiges Benefit für Patienten im Vergleich zur Placebogruppe, die arthroskopisch behandelt wurden



[101]. Zudem wird in der Literatur über die Möglichkeiten einer Knorpelschädigung durch arthroskopische Eingriffe berichtet [80, 84, 90, 101, 121, 137].

Bei isolierten Knorpeldefekten kommen so genannte knochenmarkstimulierende Methoden wie Bohrung, Mikrofrakturierung und Abrasion zum Einsatz. Ziel dieser Techniken ist es, die Einwanderung pluripotenter Stammzellen aus dem Knochenmark zu erreichen, die sich nach der Bildung eines Fibrinpfropfes im Defekt in Knorpelzellen mit darauf folgender Ausbildung eines fibrokartilaginären Gewebes umwandeln [74, 85, 130].

Weiterhin erhielten Transplantationstechniken Einzug in die Behandlung von isolierten Gelenkknorpelschäden.

Die Periost- und Perichondriumtransplantation lieferte zwar gute Ergebnisse, konnte sich aber als Therapieverfahren nicht etablieren. Gründe hierfür sind die begrenzte Verfügbarkeit von Periost und Perichondrium, die potentielle Entnahmemorbidität und die schlechte Fixation der Transplantate. Zudem wurde von Transplantatverkalkungen berichtet [66, 67, 128].

Das Prinzip der autologen Knorpel-Knochen-Transplantation (KKT) besteht darin, osteochondrale Zylinder aus weniger belasteten Arealen des Gelenks zu entnehmen und diese in die geschädigte Hauptbelastungszone des Gelenks zu transplantieren [69].

In Studien mit längeren Nachbeobachtungszeiten über autologe Mosaikplastiken zeigten sich vielversprechende Ergebnisse bei kleinen bis mittelgroßen Knorpeldefekten [61, 68, 70, 87].

Als Nachteile der KKT sind im Allgemeinen die begrenzte Verfügbarkeit osteochondraler Zylinder und die ausbleibende chondrale Integration des Transplantats mit persistierender Spaltbildung zu erwähnen [50, 68]. Diese kann insbesondere bei der Mosaikplastik zur vermehrten Degeneration des übertragenen Knorpels führen [97]. Makroskopisch und mikroskopisch zeigte sich auch in Langzeituntersuchungen nach 5 Jahren ein von Faserknorpel gefüllter Spalt zwischen Transplantat und ortsständigem Gewebe. Die Entnahmestelle wird in der Folge ebenfalls von Faserknorpel bedeckt [1, 61, 68, 70, 92].

Zu den neueren Therapieverfahren zählt die autologe Chondrozytenimplantation (ACI). Bei der klassischen Methode der ACI werden die in einem ersten operativen Eingriff entnommenen und kultivierten Chondrozyten in einer Zellsuspension unter einen über den Knorpeldefekt aufgenähten Periostlappen gespritzt [21].

Die Zellsuspension sollte eine ausreichende Zellzahl an vitalen Chondrozyten besitzen. Dafür werden Knorpelzellen aus einer Knorpelbiopsie isoliert und in einem Monolayerverfahren kultiviert. Dabei kommt es zur Dedifferenzierung der Chondrozyten zu fibroblastenähnlichen Zellen. Sie verlieren ihre knorpelspezifischen morphologischen, physiologischen und biomechanischen Eigenschaften, aber ihre Teilungsrate nimmt zu. Man geht davon aus, dass

die kultivierten Zellen nach Transplantation in den Knorpeldefekt wieder redifferenzieren [16, 20, 54, 96, 122, 125, 135].

Diese Redifferenzierung konnte bisher wissenschaftlich nicht belegt werden. Zurückliegende Untersuchungen zeigen, dass ein Reparaturgewebe entsteht, das sich aus einem Mischgewebe aus hyalinartigem Knorpelgewebe, Faserknorpel und Bindegewebe zusammensetzt [17, 68, 70, 100, 116].

Klinische Studien von Peterson et al. (2002) zeigten bei 70-90 % der Patienten, deren Knorpeldefekt mit ACI und Periostlappen versorgt wurde, gute bis sehr gute klinische Ergebnisse bei einem Nachbeobachtungszeitraum von 2-11 Jahren [111]. Dies entspricht in etwa der von Minas (2001) veröffentlichten Studie, bei der eine Befundverbesserung bei 87 % der Patienten beobachtet wurde [99].

Nachteilig an der Periostlappen-gedeckten ACI ist, dass die Kambiumschicht des Periosts zahlreiche mesenchymale Stammzellen enthält. Diese Eigenschaft verleiht dem entstandenen Regeneratgewebe im Knorpeldefekt den Charakter eines Mischgewebes. Bedeutsam ist dabei die wesentlich höhere Proliferationstendenz der Fibrozyten im Vergleich zu den Chondrozyten. Zudem lässt sich in bis zu 36 % der Fälle eine revisionsbedürftige Transplantathypertrophie nachweisen. Des Weiteren wurden Kalzifizierungen im Periostlappen, Delaminationen des Periosts und Arthrofibrosen beobachtet [11, 59, 93, 98, 134].

## 5.2 Matrixassoziierte Chondrozytenimplantation

Die Mängel der konventionellen Therapien eröffnen dem „tissue-engineered cartilage“, mit der *in vitro*-Vermehrung von autologem Zellmaterial zur Züchtung von funktionellen Zell- und Gewebeersatzstrukturen, die in das defekte Gewebe eingebracht werden können, einen Erfolg versprechenden Weg als Behandlungsalternative zur Regeneration des degenerierten Knorpelgewebes [13, 52, 63].

Tissue Engineering wird definiert als eine Technik, Muttergewebe strukturell und funktionell wieder herzustellen. Langer und Vacanti (1993) nennen folgende drei Elemente, die als Grundlage des Tissue Engineerings dienen: Zellen, bioaktive Faktoren und ein Trägermaterial [72, 86].

In der Knorpelforschung versteht man darunter die matrixassoziierte Chondrozytenimplantation (MACI) oder –transplantation (MACT), die aufgrund der Verwendung von Trägermaterialien eine Modifikation der von der Arbeitsgruppe um

Brittberg (1994) erstmals vorgestellten Operationsmethode der klassischen autologen Chondrozytenimplantation (ACI) oder –transplantation (ACT) darstellt [21].

Als Trägermaterialien (Scaffolds) für die MACI stehen eine Reihe verschiedener Typen zur Verfügung, die sich in ihrer chemischen Natur unterscheiden. Sie können eingeteilt werden in Proteinpolymere (z. B. Fibrin, Kollagen, Gelantine), Kohlenhydratpolymere (z. B. Milchsäure, Agarose, Hyaluronsäure, Alginat), synthetische Polymere (z. B. Dacron, Teflon, Karbonfaser, Hydroxylapatit) und eine Kombination aus diesen Stoffgemischen. Diverse Trägermaterialien befinden sich bereits im klinischen Einsatz [10, 11, 13, 45, 72, 89, 95, 96, 104, 110]

Zellen neigen dazu, ihren Phänotyp *in vitro* nur zu behalten, wenn sie unter Bedingungen kultiviert werden, die ihrer natürlichen Umgebung gleichen. Die mechanischen und biochemischen Signale, die *in vivo* den Aufbau, die Erhaltung und den Umbau von Gewebe beeinflussen, müssen daher bei der *in vitro*-Kultivierung von Gewebekonstrukten berücksichtigt werden [126, 141]. Bei der Kultivierung vor der Transplantation zeigen die Zellen im Rahmen des Tissue Engineering eine gute Adhärenz zum Biomaterial und werden durch Manipulation nicht aus der Matrix gelöst [106].

Einerseits erlauben die dreidimensionalen Trägermaterialien den Chondrozyten ihren differenzierten Phänotyp beizubehalten und die frühzeitige Produktion von extrazellulärer Matrix, andererseits stellen sie ein Gerüst zur sicheren Verteilung der Zellen über die Defektoberfläche [47, 103].

Freed et al. (1998) zeigten, dass auf Trägermaterial kultivierte Chondrozyten in Bioreaktoren eine knorpelspezifische extrazelluläre Matrix mit Glykosaminoglykanen und Typ II-Kollagen regenerieren können [46].

Zudem lässt sich festhalten, dass für die trägergekoppelte Form der ACI kleinere Zugangswege benötigt werden. Daneben entfällt das Heben und Annähen eines Periostlappens und die Transplantate können ohne weitere Abdeckung in den Knorpeldefekt eingebracht werden. Bei intaktem Defektrand (Knorpelschulter) und ausreichender Adhärenz am subchondralen Knochen ist eine weitere Fixierung des Transplantats nicht erforderlich. Die operativen Schnitt-Naht-Zeiten lassen sich dadurch erheblich verkürzen, was neben einer geringeren Komorbidität auch zu kürzeren stationären Aufenthalten der behandelten Patienten führt [13, 52, 94].

Klinische Ergebnisse des Verfahrens der MACI sind noch recht rar. Pavesio et al. (2003) und Cherubino et al. (2003) berichteten von klinischen Befundverbesserungen unter Verwendung eines Trägermaterials auf der Grundlage von Kollagen bzw. Hyaluronsäure [34, 110]. Dies

bestätigten auch neuere Ergebnisse von sowohl Nehrer et al. (2006) als auch Behrens et al. (2006) mit Nachbeobachtungszeiten von 3 bzw. 5 Jahren [13, 104]. In der Mehrzahl der analysierten Kontrollbiopsien wurde hyalinartiges Regeneratgewebe gefunden [94, 110].

### 5.3 Eigenschaften von Trägermaterialien

Für die Züchtung von Knorpelgewebe sind bestimmte Eigenschaften der Trägermaterialien von Vorteil [75]:

- Ein dreidimensionales Biomaterial mit einer möglichst großen inneren Oberfläche ist günstig für das Zellwachstum sowie den Transport von Nährstoffen und metabolischen Abfallstoffen bei der Entstehung eines Knorpelregenerats.
- Es sollte biokompatibel und bioresorbierbar sein und einem kontrollierten Degradationsprozess mit definierter Resorptionsrate unterliegen, die einen ausreichenden Zeitraum für das Zell- und Gewebewachstum *in vitro* und *in vivo* bietet.
- Eine gute chemische Zusammensetzung begünstigt den ungestörten Ablauf von Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung. Während des Degradationsprozesses dürfen keine toxischen Substanzen freigesetzt werden.
- Die mechanischen Eigenschaften sollten aus funktionellen Gründen dem Umgebungsgewebe ähnlich sein und auch während der Degradationsphase ausreichend stabil bleiben.

Die Verträglichkeit mit dem umliegenden Gewebe sollte *in vivo* gewährleistet sein. Eine Entzündungsreaktion, die Einsprossung von Blutgefäßen oder eine Kapselbildung sind zu vermeiden. Ebenfalls ist eine gute Fixation des Transplantats in seiner neuen Umgebung anzustreben. Eine kostengünstige Reproduzierbarkeit des Biomaterials wäre von Vorteil. Ein weiteres Ziel ist die vollständige Degradation des Materials, die jedoch nicht zu schnell erfolgen sollte. Eine zu rasche Resorption des Trägermaterials würde die Zellen freisetzen und so keine geordnete Regeneration erlauben [32, 42, 89].

An der Entwicklung eines optimalen Trägermaterials für die MACI wird aktuell geforscht, um Fragen nach der Beschaffenheit und der Architektur des Trägermaterials sowie der Verwendung der idealen Zellzahl zu beantworten [36].

#### 5.4 Dreidimensionales trägerfreies Konstrukt (DTK)

Die Druckkultivierung von Chondrozyten ist ebenfalls Gegenstand der Forschung im Bereich der Knorpelregeneration. Durch Druck auf die Knorpelzellen während der Proliferationsphase werden die Belastungsverhältnisse der Situation *in vivo* nachgeahmt. In mehreren Studien wurde ein erhöhter Glykosaminoglykangehalt und eine gesteigerte Kollagen II-Synthese bei verminderter Kollagen I-Produktion während der Kultivierung der Zellen nachgewiesen. Zudem kann die Bildung eines stabilen Kollagennetzwerkes beobachtet werden [31, 33, 39, 62].

Darling und Athanasiou (2003) untersuchten unterschiedliche Arten der Mechano-Stimulation. Es zeigten sich Vorteile der dynamischen wechselnden Kompression im Vergleich zur gleich bleibenden Druckbelastung [39]. Die Herstellung des DTK, das in diesem Tierversuch zur klinischen Anwendung kam, erfolgte auf Grundlage dieses Prinzips.

#### 5.5 Tiermodell

Viele Studien zur Überprüfung des Verfahrens der autologen Chondrozytenimplantation werden als Kleinterversuch durchgeführt. Hierbei liegen jedoch andere Größen- und Belastungsverhältnisse sowie eine veränderte Gelenkmorphologie als beim Menschen vor. Die Übertragung solcher Ergebnisse auf die humane Anwendung ist somit kritisch zu betrachten [57, 73, 115].

Oftmals wird ein im Verhältnis zur Knorpeldicke folglich sehr großvolumiges Implantat eingesetzt, was die Eröffnung der subchondralen Platte und damit die Einwanderung von pluripotenten Zellen aus dem Markraum zur Folge hat [74, 124, 143]. Bei der klinischen Anwendung der ACI soll die Anlage solcher osteochondraler Defekte jedoch ausdrücklich vermieden werden [19, 21, 120].

In der Knorpelforschung werden als Großtiermodell Hunde, Schafe, Ziegen, Schweine und Pferde als Versuchstiere eingesetzt [8, 9, 48, 49, 57, 77, 118].

Die hier angelegte Studie wurde anhand des Tiermodells des Pferdes durchgeführt. Im Vergleich zum humanen Kniegelenk weist das des Pferdes eine ähnliche Gelenkmorphologie, Gelenkgröße und Gelenkknorpeldicke sowie ein ähnliches Verhalten der Chondrozyten in Zellkultur auf. Ebenso sind die gelenkpathologischen Veränderungen mit denen des menschlichen Kniegelenks vergleichbar [8, 49, 50, 88, 138]. Auch Frisbie et al. (2006) zeigten in einer vergleichenden tierexperimentellen Studie, dass die Gelenkknorpeldicke von Pferden im Kniegelenk der des menschlichen Kniegelenksknorpels am ehesten entspricht und

somit das Pferd als Tiermodell eine relevante Rolle für präklinische Studien zur Knorpelregeneration darstellt [49].

Die Anzahl der zur Verfügung stehenden Versuchstiere ist insbesondere bei Großtiermodellen sehr gering. Es ist davon auszugehen, dass Aufwand und Kosten derzeit limitierend auf die Durchführung von Pferdestudien wirken. Es werden mindestens fünf Implantate pro Gruppe zur sicheren Darstellung von Unterschieden gefordert [108]. Da in diesem Versuch die Tiere an beiden Kniegelenken operiert wurden, konnten jeweils sechs Transplantate an drei Pferden implantiert werden. Lediglich bei Pferd Nr. 16 (Implantat aus Kollagen I/III-Membran und Hyaluronsäure-Vlies) fand sich intraoperativ trotz zweimaliger Fixierung eine erneute Dislokation, so dass in dieser Gruppe nur fünf Implantate ausgewertet werden konnten. Bei einem Pferd der Kollagen I/III-Gruppe entwickelte sich nach dem Einbringen des Transplantats ein Kniegelenksinfekt. Da dieses Regenerat in der Folge nicht zur Bewertung herangezogen werden konnte, wurde der Entschluss gefasst, ein weiteres Tier mit diesem Implantat zu operieren. Insgesamt erfolgte die Operation an 16 Pferden.

## **5.6 Transplantat-Fixierung**

Zur Transplantat-Fixierung im Defekt befinden sich derzeit verschiedene Verfahren in der klinischen Anwendung.

Die von Frisbie et al. verwendete spezielle Ankernahttechnik zur Transplantatfixation ist mit 3 subchondralen Bohrungen verbunden [48]. Ebenso führt die Befestigung der Matrix mit resorbierbaren Minipins zur Eröffnung der subchondralen Platte [120]. Diese Verfahren gehen zwangsläufig mit dem Einwandern von Zellen aus dem Knochenmark einher, was die Untersuchungsergebnisse beeinträchtigt.

Bei der alternativen Befestigungsmethode der Transplantate mit in der Regel sechs bis acht Einzelknopfnähten wird der angrenzende, gesunde, hyaline Knorpel beschädigt.

Eine weitere Möglichkeit, die Implantate im Defektareal zu fixieren, besteht in der Verwendung von Fibrinkleber [4].

Da eine Beeinflussung der Ergebnisse durch einwandernde Zellen aus dem Knochenmark ausgeschlossen werden sollte, wurde in dieser Studie die Fibrinkleber-Fixierung angewendet.

## 5.7 Klinische Befunde

Es zeigten sich intraoperativ keine Unterschiede bezüglich der Implantation bzw. der Transplantatfixierung zwischen den einzelnen Gruppen. Hervorzuheben ist, dass die Implantate der Kollagen I-Gruppe, insbesondere im Hinblick auf die Defekthöhe, besonders exakt eingepasst werden konnten.

Bei der postoperativen Mobilisierung der Tiere zeigten sich in den veterinärmedizinischen Nachbeobachtungen keine Auffälligkeiten, die auf die Wahl des Transplantats schließen ließen. Auch die postoperativ nach 18 Monaten durchgeführten Röntgenkontrollen der Kniegelenke lieferten keinen Hinweis auf Unterschiede zwischen den Implantat-Gruppen. In einer Studie von Litzke et al. (2004), welche die Heilung von Knorpelschäden mittels autologer Chondrozytentransplantation und ohne Intervention verglich, zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den Gruppen im klinischen Outcome. Korrelierend zu unseren Ergebnissen der matrixassoziierten Chondrozytenimplantation zeigten die Pferde, die im Rahmen der erwähnten Studie der ACI unterzogen wurden, postoperativ keine Lahmheit oder signifikante Defekte in den Röntgenkontrollen [88].

Zur Auswertung der Ergebnisse in Bezug auf die Ausheilungssituation des entstandenen Regeneratgewebes wird ein Zeitraum von mindestens einem Jahr nach Implantation empfohlen [53, 108]. Die Euthanasie der Versuchstiere erfolgte daher 18 Monate nach der Transplantation.

## 5.8 Ganganalyse

Die Beurteilung der einzelnen Kniegelenke in Bezug auf das Gangbild der Pferde, die zum Zeitpunkt der Euthanasie erfolgte, wurde dadurch erschwert, dass die Tiere an beiden Knien operiert wurden.

Insgesamt zeigte sich bei 7 der 16 Pferde ein auffälliges Gangbild. Sowohl bei den mit Trägermaterial versorgten Defektarealen als auch bei den Pferden, die ein DTK erhielten, traten geringe Asymmetrien in den Bewegungsmustern auf. Eine Ausnahme stellen die mit Kollagen I-Transplantaten behandelten Tiere dar. Hier fand man keine Anzeichen einer Lahmheit.

Die Unregelmäßigkeiten im Gangbild können jedoch auch mit dem mangelnden Ausbildungsstand der Pferde in Zusammenhang stehen. So zeigten Versuche an Pferden mit unterschiedlicher Ausbildung, dass Asymmetrien im Bewegungsmuster bei Pferden mit niedrigem Ausbildungsstand, wie z. B. Galoppsportpferden oder untrainierten Haflingern,

gehäuft vorkommen. Die Bewegungsmuster bei besser ausgebildeten Pferden, wie z.B. Dressur- und Springpferden, sind meist symmetrischer [71].

Lediglich bei drei der lahmen Pferde lagen präoperative Messergebnisse des Gangbildes vor. Ein Tier davon fiel in sein altes Bewegungsmuster einschließlich der individuentypischen Abweichungen zurück und kann somit nicht zu der Gruppe der Pferde mit postoperativer Lahmheit gezählt werden. Wie viele der anderen postoperativ auffälligen Pferde bereits vor der Implantation ein asymmetrisches Gangbild zeigten, ist nicht bekannt. Daher lassen sich die erhobenen geringfügig auffälligen Befunde nicht zwangsläufig auf die stattgehabte Operation zurückführen.

## 5.9 Regeneratgewebe

### Makroskopie

Für die makroskopische Bewertung des entstandenen Regeneratgewebes sind der Füllungsgrad des Defektareals und die Integration in das umliegende Gewebe sowie die Höhe und die Oberflächenbeschaffenheit des Regenerats von besonderer Bedeutung. Der Verbindung zum Defektgrund durch Kalzifizierung und enchondrale Ossifikation wird eine gewichtigere Rolle zugeschrieben als der Integration in den orstständigen hyalinen Knorpel an den Defekträndern [36, 89, 108].

Der ursprüngliche Defekt ließ sich nach dem Eröffnen der Kniegelenke der Pferde allseits noch deutlich abgrenzen. Sowohl das DTK als auch die mit Chondrozyten versehenen Trägermaterialien Kollagen I, Kollagen I/III, Hyaluronsäure und die Kombination aus Kollagen I/III und Hyaluronsäure differierten in Bezug auf den Füllungszustand nicht signifikant voneinander. Zudem ist aufgrund der unterschiedlich stark gefüllten Defekte davon auszugehen, dass die Transplantate nach Implantation wegen anschließender Vollbelastung der Pferde teilweise im Defektareal verrutscht oder zusammen geschoben wurden. Auffällig ist, dass sich die Füllungslücken besonders in kranio-lateralen Bereichen zeigten. In einer 2008 veröffentlichten tierexperimentellen Studie am Pferd wurde ebenfalls über unterschiedliche Deckungsgrade des Defektareals berichtet [48].

Beim Menschen kommt es im Gegensatz hierzu durch eine postoperative Ruhigstellung und nachfolgende Entlastung zur besseren Fixation der Transplantate und somit zur stabilen Verankerung im Knorpeldefekt. Dies zeigen zum einen verschiedene Publikationen, zum anderen ist aus der klinischen Erfahrung bekannt, dass sowohl bei der klassischen Periostlappen-gedeckten ACI als auch bei der matrixgekoppelten Chondrozytenimplantation



kernspintomographisch und arthroskopisch eine homogene Defektfüllung beobachtet werden kann [11, 14, 94, 139]. Nicht gefüllte Bereiche des Defektareals werden deshalb dem Tiermodell angelastet. Folglich gingen die gemessenen Füllungsdefekte nicht in die Bewertung der jeweiligen Regeneratgewebe ein.

Eine häufige Ursache für Fehlschläge eines mit Periostlappen und ACI versorgten Defekts ist das Überwuchern des Defekts mit Narbengewebe [105]. Durch die Anwendung eines geeigneten Biomaterials zur Defektabdeckung oder als Trägermaterial für die Zellen kann dieses Problem weitgehend behoben werden [52, 59]. In dieser Studie beobachteten wir bei keinem der Regenerate ein über das Niveau der angrenzenden Knorpelschulter hinausgehendes Wachstum. Das Wachstum der Zellen über die Höhe des nativen Knorpels scheint demnach vom Periostlappen auszugehen.

Bezüglich der Integration der Regenerate in die benachbarte Knorpelschulter und der Verankerung mit dem subchondralen Knochen bzw. der Mineralisierungszone lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen hier angewendeten Verfahren der Knorpelersatztherapie erkennen.

#### Histologie und Immunhistochemie

Es wurden nur die Areale zur Beurteilung der Qualität herangezogen, die mit Regeneratgewebe bedeckt waren. Diese können vor allem den medio-kaudalen Bereichen der Defekte zugeordnet werden, einschließlich des Übergangs zum ortsständigen Knorpel.

Bei der histologischen und immunhistochemischen Auswertung der Präparate sind sowohl die Zellmorphologie, die Orientierung der Zellen, die extrazelluläre Matrix mit ihren hyalinspezifischen Markern, wie Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen, als auch das Vorkommen von Kollagenen von besonderem Interesse. Die Expression von Kollagen II, das einen Anteil von 90 % der Kollagene des hyalinen Knorpels ausmacht bzw. das Verhältnis von Kollagen II zu Kollagen I wird als wichtiger Parameter zur Unterscheidung von hyalinem Knorpel und Faserknorpel angesehen und gibt somit Hinweise auf die Beschaffenheit des Neoknorpels [17, 23, 102].

Nach mikroskopischer Aufarbeitung war bei keinem der Präparate die typische Struktur des hyalinen Knorpels mit seinem charakteristischen vierschichtigen Aufbau sowie der Ausbildung von Säulenchondronen zu erkennen.

Bei den jeweiligen Regeneratgeweben wurde ein relativ einheitliches Bild beobachtet. Es zeigte sich sowohl bei den mit DTK versorgten Defekten als auch in den Trägermaterialien-Gruppen eine Zweischichtigkeit des Neoknorpels. Basal befinden sich Knorpelzellen, die in

eine faserreiche Matrix eingebettet sind. Zum Gelenk hin erscheint das Gewebe bindegewebig. Die dortigen Zellen zeigen eine fibrozytäre Morphologie.

Diese Zweischichtigkeit zeigte sich ebenfalls bei der immunhistochemischen Analyse der Regenerate. Während in den gelenknahen Arealen überwiegend Kollagen I vorherrscht, so reagieren die basalen, knochennahen Abschnitte mit dem Antikörper gegen Kollagen II.

Dieses Phänomen wird auch in der humanmedizinischen Anwendung nach der klassischen Periostlappen-gedeckten ACI beobachtet [100, 116]. Auch hier fand sich in basalen Abschnitten neben Matrix-Komponenten, die im nativen hyalinen Knorpel vorkommen, eine vermehrte Kollagen II-Expression, während weiter oberflächlich faserknorpeliges Gewebe dominierte. Für dieses typische Bild von Regeneratgewebe wird in der Literatur der Begriff „hyaline-like Cartilage“, also Knorpel von hyalinartigem Charakter, verwendet. Der immunhistochemische Nachweis von Kollagen II ist als wichtiges Kriterium anzuführen, um Regeneratgewebe als „hyaline-like cartilage“ zu bezeichnen [23]. Frisbie et al. (2006) bezeichneten mit diesem Begriff Gewebe, das Zellen vom Chondrozyten-Phänotyp enthält, welche von einer perizellulären Matrix umgeben sind und keine oder nur wenige Anzeichen von Faserknorpel haben [49]. Andere Arbeitsgruppen schließen die Druckfestigkeit des Regeneratgewebes in die Beurteilung des Neoknorpels mit ein [82].

Sowohl der Regeneratknorpel der Trägermaterialien-Gruppe als auch der DTK-Gruppe erfüllen in den knochennahen Anteilen das Kriterium des immunhistochemischen Nachweises von Kollagen II sowie einer homogenen hyalinartigen Matrix und können somit in diesen Arealen als „hyaline-like cartilage“ definiert werden. Das vollständige Regenerat besteht jedoch aus einem Mischbild aus hyalinem Knorpel, hyalinartigem Knorpel und Faserknorpel und spiegelt damit bereits in der Literatur beschriebene Ergebnisse wider [17, 48, 100, 116].

Diese Beobachtungen können als Folge der unterschiedlichen biomechanischen Belastungsverhältnisse der eingebrachten Transplantate gewertet werden. Am Defektgrund finden die Knorpelzellen genügend Schutz vor mechanischer Beanspruchung und sind somit in der Lage auszudifferenzieren und folglich Kollagen II sowie eine homogene extrazelluläre Matrix zu produzieren. Zum Gelenk hin unterliegt das Implantat gewissen Scherkräften, die eine Ausbildung zu hyalinem Knorpel verhindern.

Als weiterer Grund könnte das Entstehen von Mikroläsionen der subchondralen Platte und dem damit verbundenen Einwandern von mesenchymalen Stammzellen angeführt werden. Diese differenzieren in der Folge zu Chondrozyten und sind für die Ausbildung des basal vorkommenden hyalinartigen Regeneratgewebes verantwortlich. Unter Annahme dieser

Hypothese hätten die transplantierten Chondrozyten jedoch nur wenig Einfluss auf die Bildung des Neoknorpels.

Dell'Accio et al. (2003) zeigten in einer tierexperimentellen Studie an Ziegen, dass fluoreszenzmarkierte implantierte Chondrozyten im Rahmen der klassischen ACI mindestens 14 Wochen im Defektareal persistieren, an der Integration zum Nachbarknorpel teilhaben und Bestandteil der Struktur des Regeneratgewebes werden, welches reich an Kollagen II und Proteoglykanen ist [40]. In einer weiteren tierexperimentellen Studie an Hasen konnten Grande et al. (1989) nach 6 Wochen lediglich 2,5-8 % markierte Chondrozyten im Regeneratgewebe nachweisen [60]. In beiden Studien fehlen jedoch Langzeitergebnisse. Zudem lässt sich nicht sagen, in wie weit sich diese Resultate auf das Tiermodell Pferd, bei dem andere Größen- und Belastungsverhältnisse vorliegen, übertragen lassen.

### **5.10 Schlussfolgerungen**

Die hier vorgestellte Studie diene der Klärung, ob Unterschiede zwischen dem Verfahren der matrixassoziierten Chondrozytenimplantation (MACI) auf der Basis unterschiedlicher Trägermaterialien und einem dreidimensionalen trägerfreien Konstrukt (DTK), bestehend aus druckkultivierten Knorpelzellen, zu beobachten sind.

Der klinische Befund zeigte weder postoperativ, noch bei verterinärmedizinischen Nachbeobachtungen, einschließlich einer Ganganalyse, Auffälligkeiten, die auf die Wahl des Transplantats schließen ließen.

Alle Defektareale waren nach der Euthanasie mit Regeneratgewebe gefüllt. Es konnten keine signifikanten Differenzen nach makroskopischer, histologischer und immunhistochemischer Begutachtung des gebildeten Neoknorpels zwischen den jeweiligen Verfahren herausgearbeitet werden.

Die Gesamtheit der Ergebnisse dieser Arbeit überblickend, ist die Aussage zulässig, dass sich in sämtlichen Defektarealen Reparaturgewebe gebildet hat, welches in den basalen Abschnitten als „hyaline-like cartilage“ bezeichnet werden kann, da dort Zellen vom Chondrozyt-Phänotyp vorkommen, die in eine homogene Matrix eingebettet sind und da sich dort Kollagen II nachweisen lässt. Zur Klärung der Frage, ob für diese Ergebnisse die unterschiedlichen biomechanischen Belastungsverhältnisse oder das Entstehen von Mikroläsionen der subchondralen Platte und dem damit verbundenen Einwandern von Stammzellen verantwortlich sind, sind weitere Untersuchungen nötig.

## 6 Zusammenfassung

Knorpeldefekte an den Gelenken des menschlichen Körpers sind ein häufiges Krankheitsbild in der Orthopädie und Unfallchirurgie, deren Behandlung sich weiterhin problematisch gestaltet. Seit Jahrzehnten werden sehr aufwändige Versuche unternommen, die ungenügende Regenerationsfähigkeit von Knorpel zu verbessern.

Die autologe Chondrozytenimplantation (ACI) stellt in der Therapie fokaler Knorpeldefekte ein vielversprechendes Verfahren dar. Eine Weiterentwicklung und Verbesserung dieses Therapieansatzes soll durch den Einsatz von Trägermaterialien zur Kultivierung von Chondrozyten und späterer Applikation dieser in den Knorpeldefekt erreicht werden. Auch die Druckkultivierung von Chondrozyten, bei der physiologische Belastungsverhältnisse des Knorpels *in vitro* nachgeahmt werden, ist aktuell Gegenstand der Forschung auf dem Gebiet der Knorpelregeneration.

Ziel der hier vorgestellten experimentellen Studie war es, verschiedene bereits in der klinischen Anwendung befindliche matrixassoziierte Chondrozytentransplantate mit einem dreidimensionalen trägerfreien Knorpeltransplantat zu vergleichen.

Als Versuchstier wurde das Pferd gewählt, das im Vergleich zum humanen Kniegelenk eine ähnliche Gelenkmorphologie, Gelenkgröße und Gelenkknorpeldicke sowie ein ähnliches Verhalten der Chondrozyten in Zellkultur aufweist.

Als Trägermaterialien kamen ein Kollagen I-Gel, eine Kollagen I/III-Membran, ein Hyaluronsäure-Vlies in je sechs Kniegelenken und die Kombination aus letzteren beiden in fünf Kniegelenken zum Einsatz. Die Implantation der dreidimensionalen trägerfreien Knorpelkonstrukte (DTK) erfolgte ebenfalls in sechs Kniegelenken.

Die erhobenen klinischen Befunde einschließlich der 18 Monate nach der Implantation durchgeführten Ganganalyse mit Hilfe der Computerkinematographie zeigten keine signifikanten Unterschiede, die auf die Wahl des Operationsverfahrens schließen lassen.

Bei der makroskopischen Begutachtung der Transplantate wurden in beiden Gruppen komplett gefüllte Defekte und Defekte mit Füllungslücken, besonders in kranio-lateralen Bereichen, beobachtet. Die unvollständige Defektfüllung kann der sofortigen Vollbelastung der Pferde angelastet werden. Folglich wurden nur Areale zur Beurteilung der Qualität der verschiedenen Verfahren herangezogen, die mit Regeneratgewebe bedeckt waren.

Die mikroskopische und immunhistochemische Aufarbeitung der Reparaturgewebe ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Verfahren der ACI erkennen. Sowohl bei der Versorgung mit DTK als auch nach matrixassoziiierter Chondrozytenimplantation war ein zweischichtiger Aufbau erkennbar. Während sich in den basalen Arealen eine

hyalinähnliche Knorpelschicht ausgebildet hat, imponiert das superfiziale Gewebe bindegewebig. Der Neoknorpel kann als „hyaline-like Cartilage“ bezeichnet werden. Ob Läsionen der subchondralen Platte oder die biomechanischen Belastungsverhältnisse für die Ergebnisse verantwortlich sind, muss in weiteren Untersuchungen mit dieser Fragestellung geklärt werden.

## 7 Summary

The treatment of human articular cartilage defects is a common problem in trauma surgery and orthopedics. For years scientists extensively attempt to improve the insufficient ability for the regeneration of cartilage.

The autologous chondrocyte implantation (ACI) is a promising method to heal focal chondral defects. An advancement of this rehabilitation can be achieved by the use of scaffolds for the cultivation of chondrocytes and its later application into the chondral defect. Also the technique of scaffold-free transplantation is an object of research, in which the exposure of the joint is imitated *in vitro*.

The aim of this experimental study was to compare different matrix associated chondrocyte implants (MACI), which are already used in clinic, to three-dimensional scaffold-free transplants.

The experiments were performed with horses, because of their similar cartilage morphology, size, thickness and behaviour of chondrocytes in cell culture.

As scaffolds a collagen I-gel, a collagen I/III-membrane and a hyaluronan-matrix were used in 6 joints and the combination of a collagen I/III-membrane with a hyaluronan-matrix in 5 joints. The three-dimensional scaffold-free transplant (DTK) was implanted in 6 joints.

The clinical findings, including an analysis of the lameness before euthanasia with the help of the computerkinematography, showed no significant differences that could have been referred to the different operation procedures.

The horses were euthanized after 18 months.

In the macroscopic investigation of the grafts in both groups full defects and defects with filling gaps were observed, especially in cranio-lateral areas. The gaps can be ascribed to the immediate full weight bearing of the horses after the operation. Therefore, only the filled areas were chosen to estimate the quality of the regeneration tissue.

The histologic and immunohistochemical analysis of the repair tissue did not show significant differences between the various techniques of the autologous chondrocyte implantation. DTK as well as MACI revealed a 2-layer-construction of the repair tissue. Whereas a cartilage similar to hyaline cartilage developed in the basal areas, the superficial tissue shows features of connective tissue. The new cartilage can be described as “hyaline-like cartilage”. To reveal, if lesions of the subchondral bone or the biomechanical load weight bearing are responsible for these results, further studies have to be conducted.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Ahmad CS, Guiney WB, Drinkwater CJ (2002). Evaluation of donor site intrinsic healing response in autologous osteochondral grafting of the knee. *Arthroscopy* 18 (1): 95-98
2. Aigner T, Stove J (2003). Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 55 (12): 1569-1593
3. Albrecht D, Weise K (2008). Therapie von Gelenkknorpelschaden. *Chirurg* 79 (10): 989-998
4. Andereya S, Maus U, Gavenis K, Muller-Rath R, Miltner O, Mumme T, Schneider U (2006). Erste klinische Erfahrungen mit einem neuartigen dreidimensionalen Kollagengel (CaReS) zur Behandlung fokaler Knorpeldefekte am Kniegelenk. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 144 (3): 272-280
5. Aroen A, Loken S, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, Engebretsen L (2004). Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med* 32 (1): 211-215
6. Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC (1991). Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res* 9 (3): 330-340
7. Aydelotte MB, Kuettner KE (1988). Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect Tissue Res* 18 (3): 205-222
8. Barnewitz D, Endres M, Kruger I, Becker A, Zimmermann J, Wilke I, Ringe J, Sittering M, Kaps C (2006). Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. *Biomaterials* 27 (14): 2882-2889
9. Barnewitz D, Evers A, Zimmermann J, Wilke I, Kaps C, Sittering M (2003). Tissue Engineering: Neue Behandlungsansätze bei Knorpelveränderungen bei degenerativen Gelenkerkrankungen des Pferdes - erste Ergebnisse einer Langzeitstudie. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 116 (3-4): 157-161
10. Bartlett W, Gooding CR, Carrington RW, Skinner JA, Briggs TW, Bentley G (2005). Autologous chondrocyte implantation at the knee using a bilayer collagen membrane with bone graft. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Br* 87 (3): 330-332
11. Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, Carrington RW, Flanagan AM, Briggs TW, Bentley G (2005). Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg Br* 87 (5): 640-645
12. Bartz RL, Kamaric E, Noble PC, Lintner D, Bocell J (2001). Topographic matching of selected donor and recipient sites for osteochondral autografting of the articular surface of the femoral condyles. *Am J Sports Med* 29 (2): 207-212
13. Behrens P, Bitter T, Kurz B, Russlies M (2006). Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up. *Knee* 13 (3): 194-202

14. Behrens P, Bitter T, Kurz B, Russlies M (2006). Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI) - 5-year follow-up. *Knee* 13 (3): 194-202
15. Behrens P, Bosch U, Bruns J, Erggelet C, Esenwein SA, Gaissmaier C, Krackhardt T, Lohnert J, Marlovits S, Meenen NM, Mollenhauer J, Nehrer S, Niethard FU, Noth U, Perka C, Richter W, Schafer D, Schneider U, Steinwachs M, Weise K (2004). Indikations- und Durchführungsempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft "Gewebereneration und Gewebeersatz" zur Autologen Chondrozyten-Transplantation (ACT). *Zeitschrift für Orthopädie und Ihre Grenzgebiete* 142 (5): 529-539
16. Benya PD, Shaffer JD (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30 (1): 215-224
17. Briggs TW, Mahroof S, David LA, Flannelly J, Pringle J, Bayliss M (2003). Histological evaluation of chondral defects after autologous chondrocyte implantation of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 85 (7): 1077-1083
18. Brittberg M (1999). Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop Relat Res* (367 Suppl): S147-155
19. Brittberg M (2001). Die Transplantation autogener Knorpelzellen in Gelenkflächendefekte des Kniegelenks. *Operat Orthop Traumatol* 13: 198-207
20. Brittberg M, Faxen E, Peterson L (1994 a). Carbon fiber scaffolds in the treatment of early knee osteoarthritis. A prospective 4-year followup of 37 patients. *Clin Orthop Relat Res* (307): 155-164
21. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994 b). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331 (14): 889-895
22. Brittberg M, Peterson L (1998). Introduction of an articular cartilage classification. *ICRS-Newsletter* (1): 5-8
23. Brittberg M, Peterson L, Sjogren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A (2003). Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3: 109-115
24. Bruns J, Volkmer M, Luessenhop S (1993). Pressure distribution at the knee joint. Influence of varus and valgus deviation without and with ligament dissection. *Arch Orthop Trauma Surg* 113 (1): 12-19
25. Bucher O, Wartenberg H (1997). Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 12. überarbeitete Auflage: 496
26. Buckwalter JA, Hunziker EB, Rosenberg LC (1988). Articular cartilage: Composition and structure. In: Woo SL-Y, Buckwalter JA (eds) *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*. AAOS, Park Ridge, IL: 405-425
27. Buckwalter JA, Mankin HJ (1997). Articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 612-632
28. Buckwalter JA, Mankin HJ (1998). Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 47: 487-504



29. Burkart A, Imhoff AB (1999). Therapie des Knorpelschadens. *Arthroskopie* (12): 279-288
30. Burkart A, Schoettle PB, Imhoff AB (2001). Operative Therapiemöglichkeiten des Knorpelschadens. *Unfallchirurg* 104 (9): 798-807
31. Burton-Wurster N, Vernier-Singer M, Farquhar T, Lust G (1993). Effect of compressive loading and unloading on the synthesis of total protein, proteoglycan, and fibronectin by canine cartilage explants. *J Orthop Res* 11 (5): 717-729
32. Campoccia D, Hunt JA, Doherty PJ, Zhong SP, Callegaro L, Benedetti L, Williams DF (1993). Human neutrophil chemokinesis and polarization induced by hyaluronic acid derivatives. *Biomaterials* 14 (15): 1135-1139
33. Carver SE, Heath CA (1999). Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure. *Biotechnol Bioeng* 62 (2): 166-174
34. Cherubino P, Grassi FA, Bulgheroni P, Ronga M (2003). Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 11 (1): 10-15
35. Clark AL, Barclay LD, Matyas JR, Herzog W (2003). In situ chondrocyte deformation with physiological compression of the feline patellofemoral joint. *J Biomech* 36 (4): 553-568
36. Coutts RD, Healey RM, Ostrander R, Sah RL, Goomer R, Amiel D (2001). Matrices for cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 391 Suppl: S271-279
37. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG (1997). Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 13 (4): 456-460
38. Czitrom AA, Keating S, Gross AE (1990). The viability of articular cartilage in fresh osteochondral allografts after clinical transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 72 (4): 574-581
39. Darling EM, Athanasiou KA (2003). Articular cartilage bioreactors and bioprocesses. *Tissue Eng* 9 (1): 9-26
40. Dell'Accio F, Vanlauwe J, Bellemans J, Neys J, De Bari C, Luyten FP (2003). Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Res* 21 (1): 123-131
41. Donath B (1989). Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. *Exakt-Kulzer-Druckschrift*, Norderstedt: 1-16
42. Dorotka R, Toma CD, Bindreiter U, Zehetmayer S, Nehrer S (2005). Characteristics of ovine articular chondrocytes in a three-dimensional matrix consisting of different crosslinked collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 72 (1): 27-36
43. Duchow J, Hess T, Kohn D (2000). Primary stability of press-fit-implanted osteochondral grafts. Influence of graft size, repeated insertion, and harvesting technique. *Am J Sports Med* 28 (1): 24-27

44. Erggelet C, Browne JE, Fu F, Mandelbaum BR, Micheli LJ, Mosely JB (2000). Die autologe Chondrozyten-Transplantation zur Behandlung von Knorpeldefekten des Kniegelenkes. Klinische Ergebnisse. Zentralbl Chir 125 (6): 516-522
45. Ferruzzi A, Calderoni P, Grigolo B, Gualtieri G (2004). Autologous chondrocytes implantation: indications and results in the treatment of articular cartilage lesions of the knee. Chir Organi Mov 89 (2): 125-134
46. Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G (1998). Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. Exp Cell Res 240 (1): 58-65
47. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, Langer R (1994). Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. Biotechnology (N Y) 12 (7): 689-693
48. Frisbie DD, Bowman SM, Colhoun HA, DiCarlo EF, Kawcak CE, Mcllwraith CW (2008). Evaluation of autologous chondrocyte transplantation via a collagen membrane in equine articular defects: results at 12 and 18 months. Osteoarthritis Cartilage 16 (6): 667-679
49. Frisbie DD, Cross MW, Mcllwraith CW (2006). A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. Vet Comp Orthop Traumatol 19 (3): 142-146
50. Frisbie DD, Morisset S, Ho CP, Rodkey WG, Steadman JR, Mcllwraith CW (2006). Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. Am J Sports Med 34 (11): 1824-1831
51. Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K (2006). Biologische Knorpelrekonstruktion im Kniegelenk. Unfallchirurg (7): 563-576
52. Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K (2005). Stellenwert und Technik der Autologen Chondrozyten-Transplantation. Zentralbl Chir 130 (4): 327-332
53. Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ (1980). Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. J Bone Joint Surg Am 62 (1): 79-89
54. Fuss M, Ehlers EM, Russlies M, Rohwedel J, Behrens P (2000). Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. Ann Anat 182 (4): 303-310
55. Gelse K, Poschl E, Aigner T (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev 55 (12): 1531-1546
56. Ghadially JA, Ghadially R, Ghadially FN (1977). Long-term results of deep defects in articular cartilage. A scanning electron microscope study. Virchows Arch B Cell Pathol 25 (2): 125-136
57. Giannoni P, Crovace A, Malpeli M, Maggi E, Arbico R, Cancedda R, Dozin B (2005). Species variability in the differentiation potential of in vitro-expanded articular chondrocytes restricts predictive studies on cartilage repair using animal models. Tissue Eng 11 (1-2): 237-248
58. Gomoll AH, Probst C, Farr J, Cole BJ, Minas T (2009). Use of a Type I/III Bilayer Collagen Membrane Decreases Reoperation Rates for Symptomatic Hypertrophy After Autologous Chondrocyte Implantation. Am J Sports Med 37 Suppl 1: 20-23

59. Gooding CR, Bartlett W, Bentley G, Skinner JA, Carrington R, Flanagan A (2006). A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type I/III collagen covered. *Knee* 13 (3): 203-210
60. Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M (1989). The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 7 (2): 208-218
61. Hangody L, Fules P (2003). Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2: 25-32
62. Hansen U, Schunke M, Domm C, Ioannidis N, Hassenpflug J, Gehrke T, Kurz B (2001). Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering. *J Biomech* 34 (7): 941-949
63. Hepp P, Bader A, Josten C, Rose T, Schlulz R (2005). Tissue Engineering von Knorpelzellen. *Arthroskopie* 2005 18: 233–238
64. Hertsch B (1987). Die klinische Lahmheitsuntersuchung. In: Kongress über Pferdechirurgie und Pferdesportmedizin, Genf 1987 (Edition: Assoc. Suisse de Medicine Equine, 1-15)
65. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M (2002). Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 18 (7): 730-734
66. Hoikka VE, Jaroma HJ, Ritsila VA (1990). Reconstruction of the patellar articulation with periosteal grafts. 4-year follow-up of 13 cases. *Acta Orthop Scand* 61 (1): 36-39
67. Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PS, van der Linden AJ (1990). Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 72 (6): 1003-1007
68. Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R (2003). Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am* 85-A (2): 185-192
69. Horas U, Schnettler R (2002). Knorpeldefekte am Kniegelenk und autogene osteochondrale Zylindertransplantation. *Operat Orthop Traumatol* 14: 237-252
70. Horas U, Schnettler R, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T (2000). Knorpelknochen transplantation versus autogene Chondrocytentransplantation. Eine prospektive vergleichende klinische Studie. *Chirurg* 71 (9): 1090-1097
71. Hübner A (2006). Quantifizierung von Störeffekten beim Vorführen des Pferdes durch Untergrund und Biegung. Magisterarbeit an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für spezielle Zoologie und Evolutionsbiologie: 18-57
72. Hunziker EB (2002). Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10 (6): 432-463
73. Hunziker EB (1999). Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 367 Suppl: 135-146

74. Hunziker EB, Rosenberg LC (1996). Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 78 (5): 721-733
75. Hutmacher DW (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21 (24): 2529-2543
76. Imhoff AB, Oetli GM (2000). Arthroscopic and Open Techniques for Transplantation of Osteochondral Autografts and Allografts in Various Joints. *Surg Technol Int VIII*: 249-252
77. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM (2001). Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am* 83-A (1): 53-64
78. Jackson R (1991). Arthroscopic Treatment of Degenerative Arthritis. MyGinty JB (ed) *Operative Arthroscopy*: 319-323
79. Jackson R, Marans H, Silver R (1988). Operative Treatment of Degenerative Arthritis of the Knee. *J Bone Joint Surg Am* 70-A: 332
80. Janzen DL, Kosarek FJ, Helms CA, Cannon WD, Jr., Wright JC (1997). Osteonecrosis after contact neodymium-yttrium aluminum garnet arthroscopic laser meniscectomy. *Am J Roentgenol* 169 (3): 855-858
81. Johnson LL (1986). Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 2 (1): 54-69
82. Jones DG, Peterson L (2006). Autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg Am* 88 (11): 2502-2520
83. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R. O.: *Histologie*. 5., neu übers. und aktualisierte Aufl. ed: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 83-90, 2002.
84. Kim HK, Moran ME, Salter RB (1991). The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 73 (9): 1301-1315
85. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O (2004). Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 86-A (3): 455-464
86. Langer R, Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science* 260 (5110): 920-926
87. Laprell H, Petersen W (2001). Autologous osteochondral transplantation using the diamond bone-cutting system (DBCS): 6-12 years' follow-up of 35 patients with osteochondral defects at the knee joint. *Arch Orthop Trauma Surg* 121 (5): 248-253
88. Litzke LE, Wagner E, Baumgaertner W, Hetzel U, Josimovic-Alasevic O, Libera J (2004). Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation. *Ann Biomed Eng* 32 (1): 57-69
89. Lu L, Zhu X, Valenzuela RG, Currier BL, Yaszemski MJ (2001). Biodegradable polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res* 391 Suppl: S251-270

90. Lu Y, Edwards RB, 3rd, Cole BJ, Markel MD (2001). Thermal chondroplasty with radiofrequency energy. An in vitro comparison of bipolar and monopolar radiofrequency devices. *Am J Sports Med* 29 (1): 42-49
91. Magnuson PB (1941). Joint Debridement. Surgical Treatment of Degenerative Arthritis. *Surg Gynecol Obstet* (73): 1-9
92. Makino T, Fujioka H, Kurosaka M, Matsui N, Yoshihara H, Tsunoda M, Mizuno K (2001). Histologic analysis of the implanted cartilage in an exact-fit osteochondral transplantation model. *Arthroscopy* 17 (7): 747-751
93. Marlovits S, Kutscha-Lissberg F, Aldrian S, Resinger C, Singer P, Zeller P, Vecsei V (2004). Autologe Chondrozytentransplantation zur Behandlung von Knorpeldefekten des Kniegelenks - Techniken und Ergebnisse. *Radiologe* 44 (8): 763-772
94. Marlovits S, Nürnberger S, Kolonja A, Singer P, Zeller P, Mandl I, Vécsei V (2004). Matrixgekoppelte autologe Chondrozytentransplantation. *Trauma Berufskrankheiten* 6: 314-323
95. Marlovits S, Striessnig G, Kutscha-Lissberg F, Resinger C, Aldrian SM, Vecsei V, Trattnig S (2005). Early postoperative adherence of matrix-induced autologous chondrocyte implantation for the treatment of full-thickness cartilage defects of the femoral condyle. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 13 (6): 451-457
96. Marlovits S, Tichy B, Truppe M, Gruber D, Vecsei V (2003). Chondrogenesis of aged human articular cartilage in a scaffold-free bioreactor. *Tissue Eng* 9 (6): 1215-1226
97. Meyer C, Horas U, Horbelt R, Schnettler R (2005). Implantatdislokation bei künstlichem Knorpelersatz (SaluCartilage). *Unfallchirurg* 108 (2): 163-166
98. Micheli LJ, Browne JE, Erggelet C, Fu F, Mandelbaum B, Moseley JB, Zurakowski D (2001). Autologous chondrocyte implantation of the knee: multicenter experience and minimum 3-year follow-up. *Clin J Sport Med* 11 (4): 223-228
99. Minas T (2001). Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. *Clinical orthopaedics and related research* 391 Suppl: S349-361
100. Moriya T, Wada Y, Watanabe A, Sasho T, Nakagawa K, Mainil-Varlet P, Moriya H (2007). Evaluation of reparative cartilage after autologous chondrocyte implantation for osteochondritis dissecans: histology, biochemistry, and MR imaging. *J Orthop Sci* 12 (3): 265-273
101. Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ, Menke TJ, Brody BA, Kuykendall DH, Hollingsworth JC, Ashton CM, Wray NP (2002). A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 347 (2): 81-88
102. Naumann A, Dennis JE, Awadallah A, Carrino DA, Mansour JM, Kastenbauer E, Caplan AI (2002). Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem* 50 (8): 1049-1058
103. Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, Sledge CB, Yannas IV, Spector M (1998). Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials* 19 (24): 2313-2328

104. Nehrer S, Domayer S, Dorotka R, Schatz K, Bindreiter U, Kotz R (2006). Three-year clinical outcome after chondrocyte transplantation using a hyaluronan matrix for cartilage repair. *Eur J Radiol* 57 (1): 3-8
105. Nehrer S, Spector M, Minas T (1999). Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. *Clin Orthop Relat Res* (365): 149-162
106. Nehrer S, Vavken P, Dorotka R, Kotz R (2005). Matrixassoziierte Chondrozytentransplantation - Biomaterialien in der Knorpelzelltransplantation. *Arthroskopie* 2005 18: 203-208
107. O'Driscoll SW (1998). The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 80 (12): 1795-1812
108. O'Driscoll SW (2001). Preclinical cartilage repair: current status and future perspectives. *Clin Orthop Relat Res* (391 Suppl): S397-401
109. Outerbridge RE (1961). The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br* 43-B: 752-757
110. Pavesio A, Abatangelo G, Borriero A, Brocchetta D, Hollander AP, Kon E, Torasso F, Zanasi S, Marcacci M (2003). Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects: preliminary clinical findings. *Novartis Found Symp* 249: 203-241
111. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A (2002). Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med* 30 (1): 2-12
112. Ponomarev I, Paul D, Neumann M, Wilke I (2006). Scaffold-free chondrocyte transplantation as alternative to matrix associated chondrocyte transplantation. Posterpräsentation ECM-Kongress, Davos (Schweiz) 26.-29.06.2006
113. Pridie KH (1959). A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg Br* (41): 618-619
114. Radin EL, Rose RM (1986). Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Relat Res* (213): 34-40
115. Reinholz GG, Lu L, Saris DB, Yaszemski MJ, O'Driscoll SW (2004). Animal models for cartilage reconstruction. *Biomaterials* 25 (9): 1511-1521
116. Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Roberts S (1999). Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br* 81 (6): 1064-1068
117. Rudert M, Wirth CJ (1998). Knorpelregeneration und Knorpelersatz. *Orthopäde* 27 (5): 309-321
118. Russlies M, Ruther P, Koller W, Stomberg P, Behrens P (2003). Biomechanische Eigenschaften von Knorpelersatzgewebe nach verschiedenen Methoden der Knorpeldefektbehandlung beim Schaf. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 141 (4): 465-471

119. Salk RS, Chang TJ, D'Costa WF, Soomekh DJ, Grogan KA (2006). Sodium hyaluronate in the treatment of osteoarthritis of the ankle: a controlled, randomized, double-blind pilot study. *J Bone Joint Surg Am* 88 (2): 295-302
120. Schewe B, Fritz J, Gaissmaier C, Weise K (2006). Knorpelzelltransplantation: Operationstechnik mit matrixassoziierten Chondrozyten. *Unfallchirurg* 109 (7): 577-582
121. Schmid A, Schmid F (1987). Results after Cartilage Shaving Studied by Electron Microscopy. *Am J Sports Med* (15): 386-387
122. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J (2002). Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 10 (1): 62-70
123. Schnettler R, Horas U, Meyer C (2008). Autologe osteochondrale Transplantate. *Orthopäde* 37 (8): 734-742
124. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ (1993). Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75 (4): 532-553
125. Sittinger M, Braunling J, Kastenbauer E, Hammer C, Burmester G, Bujia J (1997). Untersuchungen zum Vermehrungspotential von Nasenseptum-Chondrozyten für die In-vitro-Zucht von Knorpeltransplantaten. *Laryngorhinootologie* 76 (2): 96-100
126. Sittinger M, Perka C, Schultz O, Haupl T, Burmester GR (1999). Joint cartilage regeneration by tissue engineering. *Z Rheumatol* 58 (3): 130-135
127. Skoog T, Johansson SH (1976). The formation of articular cartilage from free perichondrial grafts. *Plast Reconstr Surg* 57 (1): 1-6
128. Spahn (2007). Therapie des Knorpelschadens. *Akt Traumatol* 2007 (37): 16-30
129. Spahn G (2006). Knorpelschaden und Gonarthrose, Teil I: Physiologie und Pathophysiologie des Knorpels und der Gonarthrose. *Akt Traumatol* (36): 195-207
130. Spahn G (2007 a). Knorpelschaden und Gonarthrose, Teil IV: Operative Behandlung von Knorpelschäden und Gelenkdébridement. *Akt Traumatol* (37): 16-30
131. Spahn G, Wittig R, Kahl E, Klinger HM, Muckley T, Hofmann GO (2007 b). Diagnostik von Knorpelschäden des Kniegelenks: Validität der klinischen, radiologischen und kernspintomographischen Diagnostik im Vergleich zur Arthroskopie. *Unfallchirurg* 110 (5): 414-424
132. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ (1999). Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk. *Orthopäde* 28 (1): 26-32
133. Steinhagen J, Niggemeyer O, Bruns J (2001). Ätiologie und Pathogenese der Osteochondrosis dissecans tali. *Orthopäde* 30 (1): 20-27
134. Steinwachs M, Kreuz P (2005). Nichtmatrixgebundene Chondrozytentransplantation. *Arthroskopie* 18: 198-202

135. Stewart MC, Saunders KM, Burton-Wurster N, Macleod JN (2000). Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *J Bone Miner Res* 15 (1): 166-174
136. Tajima S, Aoyagi F, Maruyama Y (1978). Free perichondrial grafting in the treatment of temporomandibular joint ankylosis. Preliminary report. *Plast Reconstr Surg* 61 (6): 876-880
137. Thal R, Danziger MB, Kelly A (1996). Delayed articular cartilage slough: two cases resulting from holmium:YAG laser damage to normal articular cartilage and a review of the literature. *Arthroscopy* 12 (1): 92-94
138. Todhunter RJ, Minor RR, Wootton JA, Krook L, Burton-Wurster N, Lust G (1993). Effects of exercise and polysulfated glycosaminoglycan on repair of articular cartilage defects in the equine carpus. *J Orthop Res* 11 (6): 782-795
139. Trattinig S, Plank C, Pinker K, Striessnig G, Mlynarik V, Nobauer I, Marlovits S (2004). Bildgebende Diagnostik von Knorpelersatztherapien. *Radiologe* 44 (8): 748-755
140. von der Mark K, Gluckert K (1990). Biochemische und molekularbiologische Aspekte zur Früherfassung humaner Arthrosen. *Orthopäde* 19 (1): 2-15
141. Vunjak-Novakovic G, Martin I, Obradovic B, Treppo S, Grodzinsky AJ, Langer R, Freed LE (1999). Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *J Orthop Res* 17 (1): 130-138
142. Wagner H (1972). Möglichkeiten und klinische Erfahrungen mit der Knorpeltransplantation. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* (110): 708-715
143. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76 (4): 579-592
144. Welsch U. Sobotta Lehrbuch Histologie. 2. völlig überarbeitete Auflage ed: Urban & Fischer Verlag München 2006.
145. Wienecke H, Lobenhoffer P (2003). Grundlagen radiochirurgischer Systeme und ihre Anwendungen in der Arthroskopie. *Unfallchirurg* 106 (1): 2-12
146. Wilke I, Ponomarev I. Manufacturing process for three-dimensional tissue structures and structures obtainable thereby. European Patent EP1550716. In: [www.freepatentsonline.com/EP1550716A1.html](http://www.freepatentsonline.com/EP1550716A1.html), ed, 2005.



## 9 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

## 10 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Nutzung des von ihm gegründeten Labors für experimentelle Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Giessen. Nur durch sein außergewöhnliches Engagement in der Forschung in dem Bereich Unfallchirurgie und Orthopädie konnte dieses Projekt entstehen.

Herrn PD Dr. Christof Meyer danke ich außerordentlich für die intensive Betreuung bei der Entstehung dieser Dissertationsarbeit. Er stand mir mit seinem fachlichen Rat immer zur Seite und motivierte mich fortwährend.

Die Mitarbeiter des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. vet. Sabine Wenisch und Frau PD Dr. Kathrin Lips unterstützten mich bei der Durchführung der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen.

Dem Team des FZMB unter der Leitung von Dr. med. vet. Barnewitz danke ich für die gute Zusammenarbeit mit einer immer vorhandenen Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Boedecker und Herrn Pabst vom Institut für medizinische Statistik und Dokumentation der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der statistischen Auswertung.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dipl. biol. Igor Ponomarev und Herrn Dr. rer. nat. Ingo Wilke bedanken, die für die Knorpelzellzüchtung und für die Herstellung der DTK-Transplantate verantwortlich waren.

Der Arbeitsgruppe des Unfallchirurgischen Universitätsklinikums Wien um Herrn ao. Univ.-Prof. Marlovits danke ich für die hervorragende Kooperation.

Ich danke meiner Familie und Monika für ihren Rückhalt und ständige Unterstützung.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
**STAUFENBERGRING 15**  
**D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN: 978-3-8359-6021-3



9 783835 196021 3